

**DER EINFLUSS VON SRC-KINASEN  
AUF DIE SIGNALTRANSDUKTION DES  
INTERLEUKIN-33-REZEPTORS IN MASTZELLEN**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Tobias Löhn  
geboren am 29.12.1983 in Erfurt

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Thomas Kamradt, Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. Frank-Dietmar Böhmer, Jena
3. Prof. Dr. med. Axel Roers, Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.03.2012

*Meinen Eltern gewidmet*

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius, Einheit für Temperatur
μ	mikro-
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APS	Adenosinphosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMMC	engl. <i>bone marrow derived mast cell</i>
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i>
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
c-Src	engl. <i>cellular sarcoma</i>
Da	Dalton, Einheit für atomare Masse
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i>
FcεRI	hochaffiner Immunglobulin-E-Rezeptor
FGFR	engl. <i>fibroblast growth factor receptor</i>
FSC	engl. <i>forward scatter channel</i>
g	Gramm, Einheit für Masse
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
Grb2	engl. <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
h	human
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HMC-1	engl. <i>human mastocytoma cell line 1</i>
HRP	engl. <i>horseraddish peroxidase</i>

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF-1R	engl. <i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1RAcP	engl. <i>IL-1-receptor accessory protein</i>
IL-33R	Interleukin-33-Rezeptor
IMDM	engl. <i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium</i>
IRAK	engl. <i>IL-1 receptor-associated kinase</i>
JNK	engl. <i>c-jun N-terminal kinase 1</i>
k	kilo-
k.A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
l	Liter, Einheit für Volumen
M	molare Masse, SI-Einheit kg/mol
m	murin
m	milli-
mAb	engl. <i>monoclonal antibody</i>
MAPK	MAP-Kinasen, engl. <i>mitogen-activated protein kinases</i>
M-CSFR	engl. <i>macrophage colony stimulating factor receptor</i>
min	Minute
MyD88	engl. <i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
n.d.	nicht detektierbar
NF- $\kappa$ B	engl. <i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
p	phospho-
p38	MAP-Kinase p38
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PDGFR	engl. <i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PKB	Proteinkinase B
PLC $\gamma$ 1	Phospholipase $\gamma$ 1
PTB-	engl. <i>phospho-tyrosine binding-</i>
r	rekombinant
RA	Rheumatoide Arthritis
Ras	engl. <i>rat sarcoma</i>

rpm	engl. <i>rounds per minute</i>
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
SCF	engl. <i>stem cell factor</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SFM	Serumfreies Medium
SH2-	engl. <i>Src homology 2-</i>
s(IL-33R)	engl. <i>soluble</i> (IL-33R)
Src-K	Src-Kinasen
SSC	engl. <i>sideways scatter channel</i>
TBS	engl. <i>Tris-buffered saline</i>
TBST	TBS plus Tween <sup>®</sup> (Polysorbat 20)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
tg	transgen
Thr	Threonin
Th-Zelle	T-Helferzelle
TIR-	Toll-like-/IL-1R-
TKD	Tyrosinkinase-Domäne
TM	Trockenmilchpulver
TNF- $\alpha$	engl. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TRAF6	engl. <i>tumor necrosis factor receptor-associated factor 6</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
2.1	Mastzellen	3
2.2	Interleukin-33 (IL-33) und dessen Rezeptor (IL-33R)	5
2.2.1	Signaltransduktion und biologische Effekte	5
2.2.2	Klinische Bedeutung	8
2.3	Der <i>stem cell factor</i> (SCF) und dessen Rezeptor c-Kit	10
2.4	Src-Kinasen als Bestandteil zellulärer Signaltransduktionsprozesse	12
<b>3</b>	<b>ZIELSTELLUNG</b>	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>METHODIK</b>	<b>16</b>
4.1	Materialien	16
4.1.1	Verbrauchsmaterialien	16
4.1.2	Kits und Reagenzien	16
4.1.3	Pharmakologische Inhibitoren	17
4.1.4	Antikörper	19
4.1.5	Zytokine	22
4.1.6	Zellkulturmedien	22
4.1.7	Puffer und Lösungen	23
4.1.8	Geräte	24
4.1.9	Software	24
4.2	Methoden	25
4.2.1	Mäuse	25
4.2.2	Zellkultur und Generierung von BMMCs	25
4.2.3	Zellstimulation und -lyse	26
4.2.4	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
4.2.5	Western Blot	28
4.2.6	Densitometrische Auswertung	28
4.2.7	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	29
4.2.8	Co-Immunopräzipitation	29

4.2.9	Durchflusszytometrie	30
4.2.10	Statistische Auswertung	31
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>32</b>
5.1	Voruntersuchungen: Src-Kinasen und die Signaltransduktion des IL-33-Rezeptors in HMC-1-Zellen	32
5.1.1	Charakterisierung von IL-33-induzierten Signalwegen	32
5.1.2	Charakterisierung der IL-33-induzierten Zytokinsekretion	35
5.1.3	Die Bedeutung von Src-Kinasen für IL-33-induzierte Signalwege	37
5.1.4	Die Bedeutung von Src-Kinasen für die IL-33-induzierte Zytokinsekretion	39
5.1.5	Von Src-Kinasen abhängige und unabhängige Signalwege und deren Einfluss auf die IL-33-induzierte Zytokinsekretion	41
5.2	Src-Kinasen und die Signaltransduktion des IL-33-Rezeptors in primären Mastzellen	43
5.2.1	<i>il-33<sup>r/-</sup></i> -BMMCs: Spezifitätsnachweis der IL-33-/IL-33R-Interaktionen	44
5.2.2	Analyse der Rolle von c-Kit mittels <i>kit<sup>D814V</sup></i> -transgenen BMMCs	48
5.2.3	Charakterisierung des Einflusses von Src-Kinasen auf IL-33- und SCF-induzierte Signalwege in Wildtyp-BMMCs	51
5.2.4	Charakterisierung des Einflusses von Src-Kinasen auf die IL-33- und SCF-induzierte Zytokinsekretion in Wildtyp-BMMCs	53
5.2.5	<i>kit<sup>W-sh/W-sh</sup></i> -BMMCs: Validierung der Ergebnisse	55
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>58</b>
6.1	Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse	59
6.2	Mögliche Positionen der Src-Kinasen innerhalb des IL-33R-/c-Kit-Signalnetzwerkes	62
6.3	Ausblick	66
<b>7</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>82</b>



# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Interaktionen zwischen dem Zytokin Interleukin-33 und seinem Rezeptor IL-33R sind bis dato vor allem an Mastzellen und Typ-2-T-Helferzellen ( $T_H2$ -Lymphozyten,  $T_H2$ -Zellen) untersucht worden. Durch ihre pathogenetische Rolle u.a. in Tiermodellen des Asthma bronchiale, der rheumatoiden Arthritis sowie der Atherosklerose deuteten sie bereits auf eine hohe klinische Relevanz hin. Dennoch ist die Signaltransduktion des IL-33R aktuell nur unzureichend erforscht. Die Bindung von IL-33 an seinen Rezeptor bewirkt über die Assoziation intrazellulärer Adapterproteine eine Aktivierung diverser MAP-Kinasen (engl. *mitogen-activated protein kinases*) wie ERK1/2, JNK1/2 und p38 sowie des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Diese Signalprozesse führen letztendlich zur Initiierung zelltyp-spezifischer Effektorfunktionen wie z.B. der Sekretion von Entzündungsmediatoren und proinflammatorischer Zytokine durch Mastzellen. Drube et al. konnten 2010 in ihrer Studie zeigen, dass die biologische Funktion des IL-33R von der Aktivität der Rezeptortyrosinkinase c-Kit, welche auf Mastzellen konstitutiv exprimiert wird, abhängig ist: Die Kostimulation mit dem c-Kit-Liganden *stem cell factor* (SCF) ist für die vollständige Aktivierung der IL-33R-vermittelten Signaltransduktion und Zytokinsekretion notwendig. Als strukturelle Basis für diese Interaktion konnte die Formation eines Rezeptorkomplexes, bestehend aus c-Kit, IL-33R und dem *IL-1-receptor-accessory protein* (IL-1RAcP), identifiziert werden. Der genaue Mechanismus dieser Rezeptorinteraktion ist jedoch noch nicht aufgeklärt worden.

Src-Kinasen aus der Gruppe der Non-Rezeptor-Tyrosinkinasen spielen eine bedeutende Rolle in der Signaltransduktion diverser Mastzell-Rezeptoren wie c-Kit und dem hochaffinen Immunglobulin-E-Rezeptor Fc $\epsilon$ RI. Aus diesem Grund ist im Rahmen dieser Arbeit der hypothetische Einfluss von Src-Kinasen auf das von Drube et al. beschriebene, gemeinsam vom IL-33R und c-Kit ausgehende Signalnetzwerk in Mastzellen untersucht worden.

Zur Bearbeitung der Fragestellung dieser Arbeit sind zunächst Voruntersuchungen mit Hilfe der Mastzelllinie HMC-1, welche u.a. eine konstitutiv aktive c-Kit-Mutante exprimieren, durchgeführt worden. Die Erkenntnisse dieser Voruntersuchungen konnten auf primäre, *in vitro* ausdifferenzierte murine Mastzellen (engl. *bone marrow derived mast cells*, BMMCs) übertragen werden. Zur Analyse der c-Kit-Aktivierung als Voraussetzung für die Beteiligung von Src-Kinasen an den untersuchten

Signalprozessen erfolgten äquivalente Experimente mit c-Kit-defizienten *kit<sup>W-sh/w-sh</sup>*-BMMCs sowie mit *kit<sup>D814V</sup>*-transgenen BMMCs, welche die konstitutiv aktive c-Kit-Mutante *D814V* exprimieren. Der Spezifitätsnachweis erfolgte mittels IL-33R-defizienten *il-33r<sup>-/-</sup>*-BMMCs. Bezug nehmend auf frühere Publikationen wurden die verwendeten Zellen mit IL-33 und SCF (jeweils als Einzel- bzw. Kostimulation) stimuliert und anschließend die Phosphorylierung diverser intrazellulärer Signalproteine mittels Western Blot detektiert sowie die Sekretion von IL-6 bzw. IL-8 mit Hilfe eines spezifischen ELISA gemessen. Durch die jeweilige Präinkubation mit dem spezifischen Src-Kinase-Inhibitor SU6656 konnte der zu untersuchende Einfluss von Src-Kinasen auf die IL-33R/c-Kit-Signaltransduktion charakterisiert werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass wichtige Bestandteile der IL-33R-Signaltransduktion in Mastzellen wie ERK1/2, JNK1/2, NF-κB sowie der Proteinkinase-B-/Akt-Signalweg durch Src-Kinasen aktiviert werden. Ebenso wird eine IL-33-induzierte Phosphorylierung der c-Kit-Tyrosinreste 719 (murin) bzw. 721 (human) durch Src-Kinasen vermittelt. Als Voraussetzung für die Beteiligung von Src-Kinasen an der IL-33R-Signaltransduktion konnte die Aktivierung von c-Kit durch SCF identifiziert werden. Src-Kinasen stellen somit erst nach Prästimulation von c-Kit mit SCF einen Bestandteil des IL-33R-Signalings dar. Auch die beispielhaft für IL-33R-vermittelte Mastzell-Effektorfunktionen untersuchte Sekretion von IL-6 erfolgt lediglich nach Kostimulation mit SCF unter Beteiligung von Src-Kinasen.

Src-Kinasen spielen somit eine wesentliche Rolle nicht nur in der Initiierung und Regulierung eines von dem Zytokinrezeptor IL-33R sowie der Rezeptortyrosinkinase c-Kit gemeinsam ausgehenden Signalnetzwerkes, sondern auf diesem Weg auch in der Induzierung von IL-33R-vermittelten Mastzell-Effektorfunktionen. Dysregulationen derartiger komplexer Signalkaskaden spielen somit möglicherweise eine Rolle in der Entstehung verschiedener Krankheitsprozesse und lassen Src-Kinasen aus diesem Grund als einen hypothetischen pharmakologischen Angriffspunkt erscheinen. Notwendig sind hierzu neben der Identifizierung der exakt beteiligten Src-Kinase und ihrer genauen Position innerhalb des beschriebenen Signalnetzwerkes auch entsprechende *in-vivo*-Experimente am Tiermodell.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Mastzellen

Mastzellen entwickeln sich aus CD34<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup> pluripotenten Stammzellen des Knochenmarkes. Nach Zirkulation dieser Vorläuferzellen in Blut und Lymphsystem erfolgt die Migration in das lockere Bindegewebe, welches vor allem mit Grenzoberflächen wie der äußeren Haut, der Nasal-, Bronchial- und Gastrointestinalmukosa, aber auch mit Blutgefäßen, Nervenscheiden, Synovialmembranen und serösen Häuten assoziiert ist. Hier reifen die Vorläuferzellen unter dem Einfluss von SCF zu gewebständigen Mastzellen aus. (Prussin und Metcalfe 2006).

Lange Zeit wurden Mastzellen lediglich als Effektorzellen in anaphylaktischen Entzündungen angesehen. Die Bindung eines Antigens an Immunglobulin E (IgE), welches wiederum an den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI gebunden ist, führt über eine Rezeptorkreuzvernetzung zur Mastzell-Aktivierung und damit zu einer gesteigerten Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren. Diese werden klassischerweise in drei Kategorien unterteilt: präformierte, in Granula gespeicherte Mediatoren (z.B. Histamin, Heparin, Serinproteasen), *de novo* synthetisierte Lipidmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene) und diverse Zytokine wie IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, *tumor necrosis factor α* (TNF-α) und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF). Die IgE-abhängige Mastzell-Aktivierung führt letzten Endes zur Initiierung des bekannten klinischen Phänotypes einer allergischen Reaktion vom Soforttyp (Prussin und Metcalfe 2006).

Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen jedoch eine komplexere und differenziertere Beteiligung von Mastzellen an immunologischen Prozessen, welche weit über deren bekannte Rolle als Effektorzellen in Immunglobulin-E-assoziierten allergischen Erkrankungen hinausgeht.

Bedingt durch die Sekretion des bereits erwähnten breiten Spektrums an Entzündungsmediatoren, Zytokinen und Chemokinen sowie die Expression diverser Membranproteine wie *Toll-like*- und Komplementrezeptoren konnte auch eine Beteiligung von Mastzellen an Migration, Entwicklung und biologischer Funktion von Dendritischen Zellen, T- und B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Aus diesem Grund werden Mastzellen mittlerweile als Schnittstelle zwischen angeborener und

erworbener Immunität diskutiert, über welche z.B. die Abwehr bakterieller und parasitärer Infektionen vermittelt wird (Galli et al. 2005, Galli und Tsai 2010)

Mastzellen weisen neben c-Kit eine konstitutive Expression des IL-33-Rezeptors (IL-33R) auf (Rönnstrand 2004, Moritz et al. 1998). Die Stimulation mit IL-33 führt IgE-unabhängig zu einer gesteigerten Produktion und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Mediatoren (Ho et al. 2007, Moulin et al. 2007, Iikura et al. 2007, s. Kap. 2.2.1). Aufgrund ihrer zentralen Rolle im murinen und humanen Immunsystem sowie ihrer Beteiligung an der Pathogenese bedeutender IL-33-induzierter Krankheitsbilder wie Allergie, Asthma bronchiale und rheumatoider Arthritis (s. Kap. 2.2.2) wurden die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zur IL-33R-Signaltransduktion und deren Vermittlung durch Src-Kinasen an humanen und murinen Mastzellen durchgeführt.

## 2.2 Interleukin-33 (IL-33) und dessen Rezeptor (IL-33R)

### 2.2.1 Signaltransduktion und biologische Effekte

Das Zytokin Interleukin-33 (IL-33) wurde kürzlich als Ligand des *orphan*-Rezeptors T1/ST2 (welcher daher im Folgenden als IL-33-Rezeptor, IL-33R, bezeichnet wird) identifiziert (Schmitz et al. 2005). IL-33 wird sowohl im humanen als auch im murinen Organismus hauptsächlich von Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten sowie glatten Muskelzellen exprimiert (Sanada et al. 2007, Moussion et al. 2008, Miller et al. 2008) und aktuell unter Beachtung der Gemeinsamkeiten seines Sekretionsprofils mit dem des nahe verwandten Zytokins IL-1 als mögliches neues „Alarmin“, d.h. als endogenes Gefahrensignal für das Immunsystem, diskutiert.

Der IL-33R ist ein Mitglied der Toll-like-/IL-1R-(TIR-)Rezeptorsuperfamilie und kommt als membrangebundene und als lösliche (engl. *soluble*, daher im Folgenden als sIL-33R bezeichnet) Isoform vor (Arend et al 2008).

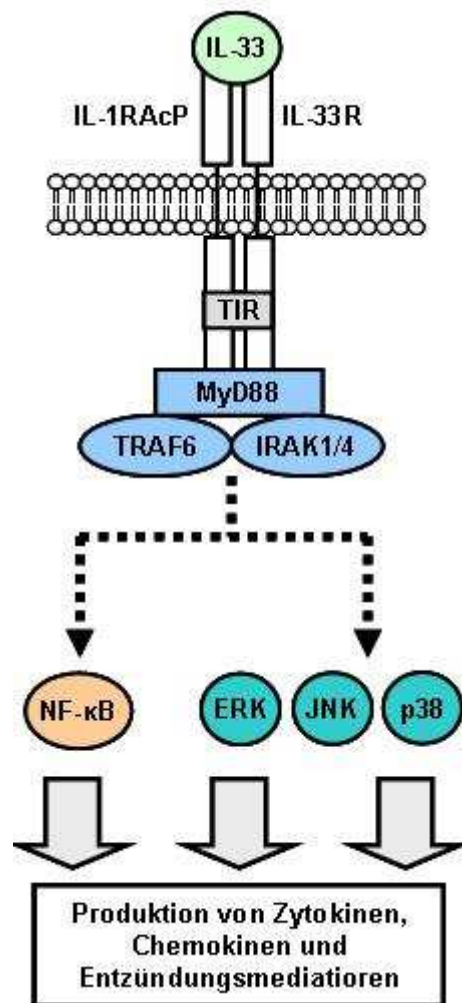
Die Expression des membrangebundenen IL-33R ist nach aktuellem Stand der Forschung nicht nur auf Zellen des hämatopoetischen Systems, wie z.B. T<sub>H</sub>2-Lymphozyten, Mastzellen, eosinophile und basophile Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen oder natürliche Killer-(NK-)Zellen beschränkt. Stattdessen konnte er ebenso auf Endothel- und Epithelzellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu T<sub>H</sub>2-Lymphozyten exprimieren T<sub>H</sub>1-Lymphozyten den IL-33R nicht (Yagami et al. 2010, Löhning et al. 1998, Xu et al. 1998, Moritz et al. 1998, Pecaric-Petkovic et al. 2009, Suzukawa et al. 2008, Brint et al. 2004, Rank et al. 2009, Smithgall et al. 2008).

Die Signaltransduktion des IL-33R ist komplex und bis dato nur teilweise erforscht. Der Rezeptorkomplex besteht aus dem eigentlichen IL-33R sowie dem *IL-1R accessory protein* (IL-1RAcP) als obligatorische Untereinheit (Chackerian et al. 2007, Ali et al. 2007).

Aktuelle Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe Kamradt am Universitätsklinikum Jena zeigen jedoch, dass die vom IL-33R ausgehenden Signalprozesse in Mastzellen und deren biologische Konsequenzen wie die Produktion proinflammatorischer Zytokine von der Rezeptortyrosinkinase c-Kit kontrolliert werden (s. Kap. 2.3). Als strukturelle Basis dieser Interaktion konnte die Formierung eines Komplexes zwischen IL-33R, IL-1RAcP und c-Kit aufgezeigt werden (Drube et al. 2010).

Die vom IL-33R ausgehende Signaltransduktion ähnelt dem Signaling anderer Rezeptoren der IL-1R-Familie, wie IL-1 $\beta$ R und IL-18R. Die Bindung von IL-33 leitet nach Bildung des Rezeptorkomplexes aus den einzelnen Untereinheiten (s.o.) die weitere Signaltransduktion zunächst durch die intrazelluläre Assoziation des *myeloid differentiation primary-response protein 88* (MyD88) an die zytoplasmatische TIR-Domäne der IL-33R-Untereinheit ein. Daraufhin kommt es zur Rekrutierung der *IL-1R-associated kinase 1* (IRAK1), IRAK4 und des *tumor necrosis factor receptor-associated factor* (TRAF6) an MyD88, wobei zellspezifische Varianten der Signaltransduktion wie die TRAF6-unabhängige Aktivierung der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) in Fibroblasten bekannt sind (Funakoshi-Tago et al. 2008). Diese führen im weiteren Verlauf zu einer Aktivierung zahlreicher Signalproteine wie dem *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) und diverser *mitogen-activated protein kinases* (MAP-Kinasen, MAPK) wie *c-jun N-terminal kinase 1* (JNK1), p38 und ERK1/2 (Brint et al. 2004, Schmitz et al. 2005, Ikura et al. 2007, Ali et al. 2007, Ho et al. 2007). Bis dato konnte nicht geklärt werden, auf welche Art und Weise die gemeinsame Nutzung dieser Signalwege durch mehrere Rezeptoren zu teilweise sehr unterschiedlichen und zelltyp-spezifischen Effektorfunktionen führt (s. Abb. 1).

Die IL-33R-vermittelte Signaltransduktion bewirkt letztendlich die Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren, welche wiederum in verschiedenen Zelltypen die Synthese von Zytokinen und Chemokinen induzieren. So ist IL-33 in T<sub>H</sub>2-Zellen in der Lage, die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-5 und IL-13 zu steigern und so im Mausmodell einen allergischen Phänotyp zu triggern (Schmitz et al. 2005). In Mastzellen führt IL-33 zu einer von der Kreuzvernetzung membrangebundener IgE-Moleküle unabhängigen Aktivierung und bewirkt auf diese Art und Weise eine starke Zunahme der Sekretion von IL-6, IL-8, IL-13 und diverser Entzündungsmediatoren wie Prostaglandin D<sub>2</sub> (Ho et al. 2007, Moulin et al. 2007, Ikura et al. 2007) sowie die Reifung und das Überleben von Mastzellen (Allakhverdi et al. 2007). Aktuelle Forschungsergebnisse belegen ebenfalls einen Einfluss von IL-33 auf die Degranulation von Mastzellen, wenn diese mit IgE vorbehandelt wurden (Pushparaj et al. 2009).



**Abb. 1: Schema der Signaltransduktion des IL-33-Rezeptors.**

Stark vereinfachte Darstellung der IL-33R-Signaltransduktion. Genaue Erläuterungen und Erklärung der verwendeten Abkürzungen: siehe Text.

### 2.2.2 Klinische Bedeutung

Interaktionen zwischen IL-33 und seinem Rezeptor sowie die sich daraus ergebenden biologischen Konsequenzen sind bis dato vor allem in Mastzellen und T<sub>H</sub>2-Zellen untersucht worden. Durch diese Arbeiten konnte eine Beteiligung dieser IL-33-/IL-33R-Interaktionen an der Pathogenese einer Reihe von bedeutenden internistischen Erkrankungen aufgezeigt werden (Kakkar und Lee 2008, Liew et al. 2010). Dies deutet auf eine große klinische Relevanz dieses Zytokines und seines Rezeptors hin.

Die Fähigkeit von IL-33, ein proinflammatorisches T<sub>H</sub>2-Zytokinmilieu zu generieren, legte u.a. eine Beteiligung an allergischen Atemwegserkrankungen nahe. So ist IL-33 im Mausmodell in der Lage, durch die Triggerung einer T<sub>H</sub>2-Zell- bzw. einer mastzellvermittelten Immunantwort eine anaphylaktische Entzündungsreaktion, bronchiale Hyperreagibilität sowie strukturelle Veränderungen im Sinne eines Asthma bronchiale zu induzieren (Liu et al. 2009, Kurowska-Stolarska et al. 2009, Kondo et al. 2008). Des Weiteren konnte sowohl im murinen Asthmadmodell als auch bei Patienten mit Asthma bronchiale eine gesteigerte Expression von IL-33 in Bronchialepithel- und glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (Kearley et al. 2009, Kurowska-Stolarska et al. 2009, Préfontaine et al. 2009). Eine aktuelle Studie belegt die Expression des IL-33-R auf endothelialen und epithelialen Zellen, nicht jedoch auf Fibroblasten und glatten Muskelzellen im Lungengewebe von Patienten mit Asthma bronchiale und deutet so auf mögliche Zielzellen des IL-33 im Rahmen des Asthma-assoziierten *airway remodellings* hin (Yagami et al. 2010).

Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen ebenfalls eine Involvierung von IL-33 in kardiovaskuläre Krankheitsprozesse. Miller et al. konnten am murinen Modell einen protektiven Effekt von IL-33 bezüglich der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen nachweisen, welcher durch die Bildung von IL-5 und gegen oxidiertes LDL gerichteter Antikörper vermittelt wird (Miller et al. 2008). Weiterhin ist IL-33 in der Lage, im gleichen Modell eine Reduktion der an der Entstehung atherosklerotischer Plaques beteiligten Bildung und Akkumulation von Schaumzellen zu bewirken (McClaren et al. 2010). Eine mögliche Assoziation zwischen IL-33 und der koronaren Herzkrankheit wird ebenfalls durch die Erkenntnis hervorgehoben, dass bei Patienten mit Myokardinfarkt die Serumkonzentration von sIL-33R ansteigt und diese mit einer verminderten linksventrikulären Pumpfunktion korreliert (Shimpo et al. 2004).



Ähnliche Erkenntnisse legen eine mögliche Verwendung von sIL-33R als Biomarker für Herzinsuffizienz nahe (Weinberg et al. 2003).

Viele der aktuell beschriebenen biologischen Eigenschaften von IL-33 beziehen sich auf dessen Fähigkeit, Immunantworten vom  $T_H2$ -Typ zu induzieren. Interessanterweise spielt IL-33 auch eine proinflammatorische Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis, welche in der Regel mit  $T_H1$ - und/oder  $T_H17$ -vermittelten Entzündungsreaktionen assoziiert ist. So konnte im Synovialgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis eine gesteigerte Expression von IL-33 nachgewiesen werden. In verschiedenen Mausmodellen führte die Applikation von IL-33 zu einer mastzellvermittelten Exazerbation der Arthritis, welche mit einer gesteigerten Produktion von Autoantikörpern und proinflammatorischen Zytokinen einhergeht. Eine Blockierung von IL-33 führt wiederum zu einer verminderten Krankheitssymptomatik (Xu et al. 2008, Palmer et al. 2009, Xu et al. 2010).

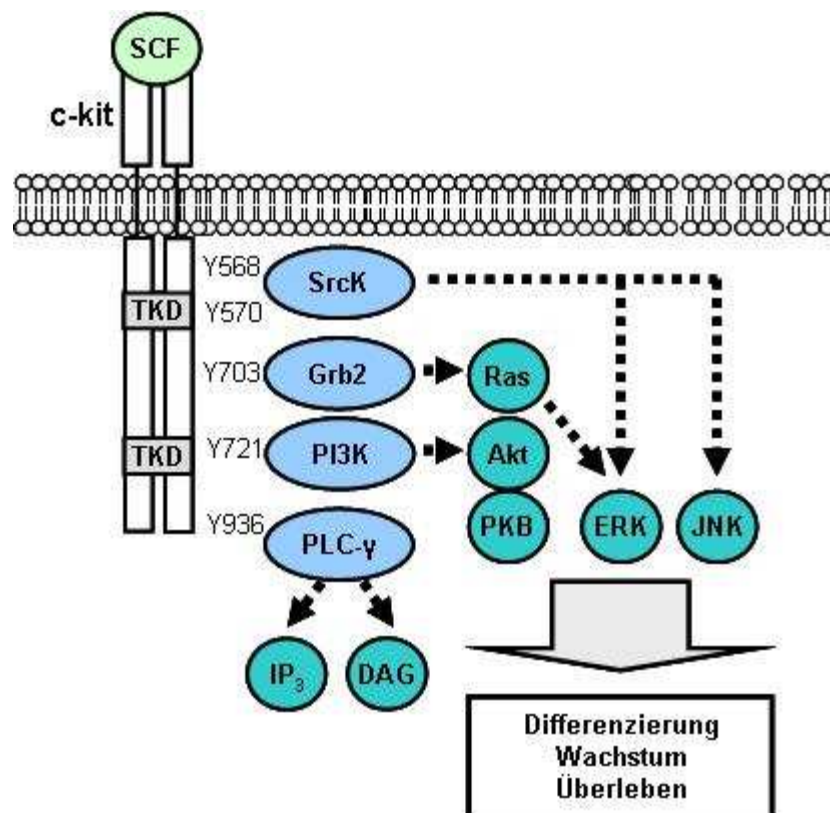
## 2.3 Der *stem cell factor* (SCF) und dessen Rezeptor c-Kit

c-kit (CD117), mit einer Molekülgröße von 145 kDa, ist der Rezeptor des *stem cell factors* (SCF) und Genprodukt des kit-Proto-Onkogens (Zsebo et al. 1990, Huang et al. 1990). Durch die Aktivierung einer Vielzahl von Signalwegen u.a. zur Regulierung von Zelldifferenzierung, -proliferation und -überleben besitzt c-Kit eine Schlüsselrolle in der Regulierung von Erythro-, Lympho- und Megakaryopoese sowie in der Entwicklung von Mastzellen, Keimzellen und Melanozyten. Im Knochenmark wird c-Kit spezifisch auf den hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert, um im weiteren Verlauf der Zellreifung herunterreguliert zu werden. Ausnahmen von dieser Regel stellen die (ausgereiften) Mastzellen sowie, als extramedulläre Zellen, die Melanozyten und die interstitiellen Zellen von Cajal dar (Rönstrand 2004, Edling und Hallberg 2007).

Als Rezeptortyrosinkinase (RTK) vom Typ III weist c-Kit eine enge strukturelle Verwandtschaft mit dem *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) und dem *macrophage colony stimulating factor receptor* (M-CSFR) auf (Yarden et al. 1987). Typ-III-RTK sind durch das Vorhandensein von fünf extrazellulären immunoglobulinähnlichen Domänen (engl. *immunoglobulin-like domains*) charakterisiert, wobei die zweite und dritte Domäne für die Bindung des Liganden SCF zuständig sind. In Übereinstimmung mit anderen RTK besteht c-Kit zusätzlich aus einer Transmembrandomäne sowie einer intrazellulären Kinase-Domäne.

Die Bindung von SCF führt zu einer Dimerisierung der Rezeptormonomere und daraufhin zu einer Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase, welche wiederum Tyrosinreste der intrazellulären Domäne autophosphoryliert. Die so entstandenen Phosphotyrosinreste (pY) dienen als Andockstelle für Signalproteine mit *Src homology 2*-(SH2-) und *phospho-tyrosine binding*-(PTB-)Domänen. Beispielsweise bindet die Phospholipase C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) an pY936, die Phosphoinositol-3-(PI-3-)Kinase an pY721, das Adaptermolekül *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) an pY703 und pY936 sowie die Src-Kinasen Lyn und Fyn an pY568 und pY570. Durch die Assoziation dieser Proteine an die genannten Phosphotyrosinreste werden weitere Signalproteine aktiviert, wie beispielsweise die MAP-Kinasen ERK1/2, p38 und JNK1/2 sowie die Proteinkinase B (PKB)/Akt (Rönstrand 2004, Roskoski 2005) (s. Abb. 2).

In einer Reihe von malignen Neoplasien kommt es zu einer abnormen Expression bzw. Funktion von c-Kit. Zum Beispiel konnte eine autokrine Produktion von SCF und damit eine autonome Stimulation von c-Kit in kleinzelligen Bronchialkarzinomen, kolorektalen Karzinomen und Mammakarzinomen nachgewiesen werden (Krystal et al. 1996, Bellone et al. 1997, Hines et al. 1999). *Gain-of-function*-Mutationen von c-Kit führen zu einer konstitutiven Phosphorylierung und Aktivierung des Rezeptors. Dieser Pathomechanismus findet sich u.a. bei der Mastozytose, Mastzell-Leukämien, akuten myeloischen Leukämien, gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) und Keimzelltumoren (Nagata et al. 1995, Furitsu et al. 1993, Hirota et al. 1998, Tian et al. 1999).



**Abb. 2: Schema der Signaltransduktion von c-Kit.**

Stark vereinfachte Darstellung der c-Kit-Signaltransduktion. Zu beachten ist, dass in der Literatur auch Aktivierungswege der aufgeführten Signalproteine beschrieben sind, welche in diesem Schema nicht gezeigt werden. TKD: Tyrosinkinase-Domäne, IP<sub>3</sub>: Inositoltriphosphat, DAG: Diacylglycerin, SrcK: Src-Kinasen, Ras: *rat-sarcoma*-G-Protein. Genaue Erläuterungen und Erklärung der weiteren Abkürzungen siehe Text.

## 2.4 Src-Kinasen als Bestandteil zellulärer Signaltransduktionsprozesse

Src-Kinasen gehören zur Familie der Non-Rezeptor-Tyrosinkinasen und leiten sich von dem Protein c-Src (zusammengesetzt aus *cellular* und *sarcoma*) ab, welches nach dem gleichnamigen Protoonkogen benannt ist. Src stellt dabei den Prototyp einer Familie von neun Tyrosinkinasen dar, zu welcher zusätzlich auch die Proteine Lyn, Fyn, Blk, Yrk, Lck, Hck, Yes und Fgr zu zählen sind (Bolen et al. 1992).

Enzyme aus der Gruppe der Src-Kinasen besitzen einen weitestgehend ähnlichen strukturellen Aufbau: N-terminal befindet sich ein Glycinrest, welcher kovalent mit Myristinsäure, einer gesättigten Fettsäure, verbunden ist und damit die Verankerung des Enzymes in sog. *lipid rafts* der Zellmembran ermöglicht. Daran angrenzend ist eine sog. *unique*-Domäne lokalisiert, in welcher sich die Aminosäure-Sequenzen der einzelnen Src-Kinasen am signifikantesten voneinander unterscheiden. Die sich anschließende Region enthält eine SH3- bzw. SH2-Domäne und ermöglicht die Bindung an entsprechende Phosphotyrosinreste diverser RTK wie c-Kit. Die katalytische Domäne inklusive ATP-Bindungsstelle verkörpert den Großteil des C-terminalen Anteils von Src-Kinasen (Bolen et al. 1992).

Src-Kinasen sind auf zellulärer Ebene in eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen involviert, z.B. als Bestandteil der Signaltransduktion einer Reihe von RTK wie dem *epidermal growth factor receptor* (EGFR), dem *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) sowie von c-Kit (Belsches et al. 1997, Ralston und Bishop 1985, Hong et al. 2004, Samayawardhena und Pallen 2008).

Die Interaktionen zwischen Src-Kinasen und RTK stellen sich dabei komplex und bidirektional dar (Bromann et al. 2004):

Zum einen konnte durch zahlreiche Studien belegt werden, dass Src-Kinasen eine große Bedeutung in der Vermittlung verschiedener, von Wachstumsfaktor-Rezeptoren ausgehenden Signalwege besitzen, welche u.a. die mitogene DNA-Synthese, den *turnover* von Rezeptoren, die Zellmotilität sowie das Zellüberleben betreffen (Ware et al. 1997, Wilde et al. 1999, Chang et al. 1995, Weernink und Rijksen 1995, Karni et al. 1999).

Andererseits sind Src-Kinasen ebenso in der Lage, durch Phosphorylierung von RTK deren Aktivität und Signaltransduktion zu regulieren. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Src-Kinasen direkt und selektiv den Tyrosinrest 900 (Y900) von c-Kit

phosphorylieren können, welcher wiederum als Bindungsstelle für das Signalprotein CrkII dient (Lennartsson et al. 2003).

Weiterhin spielen Src-Kinasen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion des Rezeptors FcεRI auf Mastzellen, welcher als hochaffiner Fc-Rezeptor für IgE-Moleküle nach Allergenbindung in der Lage ist, die Degranulation von Mastzellen zu induzieren und damit größte klinische Bedeutung in der Initiierung und Aufrechterhaltung allergischer Entzündungsreaktionen besitzt (Parravicini et al. 2002, Odom et al. 2004).

### 3 ZIELSTELLUNG

Mastzellen spielen eine Schlüsselrolle in der Initiierung und Aufrechterhaltung von Effektorfunktionen sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunität (Galli und Tsai 2010). Im Mittelpunkt präklinischer und klinischer Studien steht dabei vor allem ihre zentrale Rolle in allergischen Entzündungsreaktionen, welche nach neueren Erkenntnissen nicht nur über die bekannte antigenvermittelte Kreuzvernetzung von rezeptorgebundenem Immunglobulin E, sondern auch über die Bindung des kürzlich identifizierten Zytokins IL-33 an seinen Rezeptor IL-33R (vormals T1/ST2) induziert werden können. Aktuelle Studien berichten weiterhin über eine Beteiligung von IL-33-/IL-33R-Interaktionen an bedeutenden internistischen Krankheitsbildern wie Asthma bronchiale, Atherosklerose und rheumatoider Arthritis. Diese Erkenntnisse deuten somit auf eine große klinische Relevanz dieses Zytokins und seines Rezeptors hin (Kakkar und Lee 2008, Liew et al. 2010).

Zum besseren Verständnis IL-33R-vermittelter physiologischer und pathologischer Immunprozesse, aber auch zur möglichen Identifizierung eines neuen pharmakologischen *targets* ist es notwendig, die Signaltransduktion des IL-33-Rezeptors genauer zu analysieren. Drube et al. konnten hierzu zeigen, dass die IL-33R-Signaltransduktion in Mastzellen sowie die hierdurch induzierten biologischen Effektorfunktionen wie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine von der Rezeptortyrosinkinase c-Kit kontrolliert und verstärkt werden. Grundlage dessen ist die Formation eines Rezeptorkomplexes aus IL-33R, seiner Untereinheit IL-1RAcP und c-Kit (Drube et al. 2010).

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Erkenntnisse über die bis dato lediglich partiell erforschte Signaltransduktion des Zytokinrezeptors IL-33R in Mastzellen weiter zu vertiefen. Zur genaueren Untersuchung der IL-33R-Signaltransduktion im Allgemeinen sowie der von Drube et al. beschriebenen physischen und funktionellen Interaktion zwischen dem Zytokinrezeptor IL-33R und der Rezeptortyrosinkinase c-Kit im Speziellen gilt es, eine hypothetische Beteiligung von Src-Kinasen an der Initiierung und Regulierung eines gemeinsamen IL-33R-/c-Kit-Signalnetzwerkes zu evaluieren. Src-Kinasen gehören zur Gruppe der Non-Rezeptor-Tyrosinkinasen und stellen eine Enzymfamilie von derzeit neun Mitgliedern mit Src als Prototyp dar (Bolen et al. 1992). Sie spielen eine bedeutende Rolle in der Regulierung diverser rezeptorvermittelter Signalwege, u.a. auch im Zusammenhang mit der

Signaltransduktion von c-Kit sowie des hochaffinen Immunglobulin-E-Rezeptors FcεRI in Mastzellen (Timokhina et al. 1998, Hong et al. 2004, Shivakrupa und Linnekin 2005, Parravicini et al. 2002). Aufgrund der Tatsache, dass Src-Kinasen Bestandteil des c-Kit-Signalings in Mastzellen sind, wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die Aktivierung von c-Kit durch seinen Liganden SCF eine Voraussetzung für eine Beteiligung von Src-Kinasen an der gemeinsamen IL-33R-/c-Kit-Signaltransduktion darstellt.

Zur Untersuchung des Einflusses von Src-Kinasen auf die gemeinsame Signaltransduktion von IL-33R und c-Kit in Mastzellen wird der Effekt des spezifischen Src-Kinasen-Inhibitors SU6656 (Blake et al. 2000) auf die mittels Western Blot detektierbare Phosphorylierung von intrazellulären Signalproteinen (MAP-Kinasen wie ERK1/2, JNK1/2, p38, der Transkriptionsfaktor NF-κB, Proteinkinase-B-/Akt-Signalweg) nach Stimulation mit IL-33 bzw. SCF gemessen. Die durch diese Prozesse induzierte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 bzw. IL-8 als Beispiel für IL-33R-vermittelte Effektorfunktionen wird mittels ELISA detektiert. Die Untersuchungen wurden sowohl an Zellen der Mastzelllinie HMC-1 als auch an primären, *in vitro* ausdifferenzierten Mastzellen (engl. *bone marrow derived mast cells*, BMMCs) durchgeführt.

## **4 METHODIK**

### **4.1 Materialien**

#### **4.1.1 Verbrauchsmaterialien**

MaxiSorp 96-well-Platte, Nunc, Roskilde, Dänemark

Whatman Nitrocellulose-Membran Protran<sup>®</sup>, GE Healthcare, Little Chalfont,  
Vereinigtes Königreich

Western Blot – Filterpapier, Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland

#### **4.1.2 Kits und Reagenzien**

Kodak T-MAT PLUS DG Film, Entwickler D-19, Fixierer, Eastman Kodak Company,  
Rochester, NY, USA

Enhanced Chemiluminescence (ECL) – Detektion: SuperSignal West Pico Kit, Pierce  
Biotechnology, Rockford, IL, USA; Amersham ECL Plus Western Blotting Detection  
System, GE Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich

Human-IL-6, -IL-8-ELISA-Kit: ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland

Murine-IL-6-ELISA-Kit: eBioscience, San Diego, CA, USA

Prestained Protein Marker, Broad Range 7-175 kDa, New England Biolabs (NEB),  
Ipswich, MA, USA

Sepharose: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Streptavidin-POD: Roche Diagnostics, Risch, Schweiz

Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE): BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA



### 4.1.3 Pharmakologische Inhibitoren

Inhibitor	Chemische Daten	gelöst in	Hersteller	Verwendete Konzentration
SP600125 (JNK-Inhibitor)	6-Amino-4-(4-phenoxy-phenyl-ethylamino-) quinazolin <chem>C22H22N4O</chem>	5 mg/ml DMSO	Calbiochem, Merck / EMD, Darmstadt, Deutschland	5 µM
SU6656 (Src-Kinase-Inhibitor)	2,3-Dihydro-N,N-dimethyl-2-oxo-3-[(4,5,6,7-tetrahydro-1H-Indol-2-yl)methylen] 1H-indol-5-Sulfonamid <chem>C19H21N3O3S</chem>	25 mg/ml DMSO	Calbiochem, Merck / EMD, Darmstadt, Deutschland	2,5 bzw. 5 µM

Imatinib (Glivec <sup>®</sup> , c-Kit-Inhibitor)	4-[(4-Methylpiperazin-1-yl)methyl]-N-[4-methyl-3-[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-yl)amino]phenyl]benzamid <chem>C29H31N7O</chem>	In aqua dest.	Novartis, Basel, Schweiz	5 $\mu$ M
NF- $\kappa$ B-Inhibitor	6-Amino-4-(4-phenoxyphenylethylamino)quinazolin <chem>C22H20N4O</chem>	5 mg/ml DMSO	Calbiochem, Merck / EMD, Darmstadt, Deutschland	10 $\mu$ M
p38-Inhibitor	2-(4-Chlorophenyl)-4-(4-fluorophenyl)-5-pyridin-4-yl-1,2-dihydropyrazol-3-on <chem>C20H13ClFN3O</chem>	25 mg/ml DMSO	Calbiochem, Merck / EMD, Darmstadt, Deutschland	10 $\mu$ M
UO126 (MEK-ERK-Inhibitor)	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenylthio) butadien <chem>C18H16N*</chem> $\frac{1}{2}$ <chem>C2H5OH</chem>	200 mg/ml DMSO	Calbiochem, Merck / EMD, Darmstadt, Deutschland	5 $\mu$ M

## 4.1.4 Antikörper

### 4.1.4.1 Primärantikörper

Antikörper	Zusätze	Herkunft	Verdünnung
anti-Phospho-p38 (Thr180/Tyr182) Rabbit mAb	10 mM Natrium HEPES (pH 7,5) 150 mM NaCl 100 µg/ml BSA 50% Glycerol 0,002% Natriumazid	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	1:1000 5% TM/TBST (w/v)
anti-Phospho- NF-κB p65 (Ser536) Mouse mAb	10 mM Natrium HEPES (pH 7,5) 150 mM NaCl 100 µg/ml BSA 50% Glycerol 0,002% Natriumazid	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	1:1000 5% TM/TBST (w/v)
anti-Phospho- JNK1/2 (Thr183/Tyr185) Rabbit mAb	10 mM Natrium HEPES (pH 7,5) 150 mM NaCl 100 µg/ml BSA 50% Glycerol 0,002% Natriumazid	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	1:1000 5% TM/TBST (w/v)

anti-Phospho- ERK1/2 (Thr202/Tyr204) Mouse mAb	10 mM Natrium HEPES (pH 7,5) 150 mM NaCl 100 µg/ml BSA 50% Glycerol 0,002% Natriumazid	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	1:1000 5% TM/TBST (w/v)
anti-Phospho- STAT3	10 mM Natrium HEPES (pH 7,5) 150 mM NaCl 100 µg/ml BSA 50% Glycerol 0,002% Natriumazid	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	1:1000 5% TM/TBST (w/v)
anti-Phospho-c-Kit (Tyr719) Rabbit mAb ( <i>Maus-Tyr719 ist kreuzreaktiv mit Human-Tyr721</i> )	10 mM Natrium HEPES (pH 7,5) 150 mM NaCl 100 µg/ml BSA 50% Glycerol 0,002% Natriumazid	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	1:1000 5% TM/TBST (w/v)
anti-Total c-Kit M14	10 mM Natrium HEPES (pH 7,5) 150 mM NaCl 100 µg/ml BSA 50% Glycerol 0,002% Natriumazid	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:1000 5% TM/TBST (w/v)

anti-Caspase 3	k.A.	Dr. Krämer, Institut für Biochemie, Universitäts- klinikum Jena	1:5000 5% TM/TBST (w/v)
anti-Tubulin	k.A.	Dr. Krämer, Institut für Biochemie, Universitäts- klinikum Jena	1:5000 5% TM/TBST (w/v)
4G10 (total pY)	k.A.	Prof. Liebmann, Institut für Biochemie, Universitäts- klinikum Jena	1:5000 5% TM/TBST (w/v)
Allophycocyanin (APC) anti-human CD117 (c-Kit)	PBS, pH 7.2, <0.09% NaN <sub>3</sub>	eBioscience, San Diego, CA, USA	1:200
Anti-human T1/ST2 (IL-33R) Baf523, biotinyliert	TBS, pH 7.3, 0.1% BSA	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	1:25
Anti-Human- IL-1RAcP, biotinyliert	TBS, pH 7.3, 0.1% BSA	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	1:400
Humanes $\gamma$ - Globulin			

---

#### 4.1.4.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
goat anti-mouse-IgG-HRP	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA	1:1000
donkey anti-goat-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:1000
goat anti-rabbit-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:1000

#### 4.1.5 Zytokine

rhIL-33, rmIL-33, rmSCF: Peprotech GmbH, Hamburg, Deutschland

sIL-33R, sIL-1R1: R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

#### 4.1.6 Zellkulturmedien

RPMI-1640 (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), ergänzt mit:

- 10% FCS (hitzeinaktiviert)
- 1% Antibiotika (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)
- 50 µM Mercaptoethanol

IMDM (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), ergänzt mit:

- 10% FCS (hitzeinaktiviert)
- 1% Antibiotika (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)
- 1% Glutamin
- 50 µM Mercaptoethanol

## 4.1.7 Puffer und Lösungen

### 4.1.7.1 Chemische Zelllyse

Lysepuffer Western Blot:	1% Triton X-100, 20 mM HEPES, pH 7,5, 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM EGTA, 40 mM Glycerophosphat, 2 mM Orthovanadat, 1 mM DTT, 20 µg/ml Aprotinin, 20 µg/ml Leupeptin
Lysepuffer Co-IP:	50 mM HEPES, pH 7.4, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% NP40, 10 mM EGTA, 40 mM Glycerophosphat, 2 mM Orthovanadat, 1 mM DTT, 20 µg/ml Aprotinin, 20 µg/ml Leupeptin

### 4.1.7.2 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

10% APS (w/v)	
4x Trenngelpuffer, pH 8,8:	1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS (w/v)
4x Sammelgelpuffer pH 6,8:	0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS (w/v)
10x Laufpuffer, pH 8,3:	250 mM Tris, 2 M Glycin, 1% SDS (w/v)
6x Probenpuffer, pH 6,8:	375 mM Tris, 12% SDS (w/v), 30% Glycerol (v/v), 0,001% Bromphenolblau (w/v), 500mM DTT, ddH <sub>2</sub> O

Trenn- und Sammelgele zur Elektrophorese wurden wie folgt hergestellt (Angaben reichen für sechs Gele):

	10% Trenngel	15% Trenngel	5% Sammelgel
ddH <sub>2</sub> O	12,3 ml	7,2 ml	5,7 ml
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	9,9 ml	15 ml	1,7 ml
Puffer	7,5 ml	7,5 ml	2,5 ml
10% APS	300 µl	300 µl	100 µl
TEMED	24 µl	24 µl	15 µl

#### 4.1.7.3 Western Blot

Transferpuffer, pH 8,3:	25 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 10% Methanol (v/v)
10x TBS, pH 7,6:	0,5 M Tris, 1,5 M NaCl
Waschpuffer:	10% 10x TBS (v/v), 0,1% TWEEN 20
Blocklösungen:	5% TM/TBST (w/v), 1% TM/TBST (w/v), 1% BSA/TBST (w/v)

#### 4.1.7.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

PBS:	136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7,9 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
Beschichtungspuffer, pH 9,6:	50 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3$
Blockpuffer:	1% BSA/PBS (w/v)
Waschpuffer:	0,1% TWEEN 20/PBS
Farbstoffreaktion:	0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat, 0,1 M Zitronensäure, OPD (o-Phenylen-Diamin), $\text{H}_2\text{O}_2$

#### 4.1.7.5 Durchflusszytometrie (FACS)

PBA:	PBS; 0,25% BSA, 0,02% Natriumazid
------	-----------------------------------

#### 4.1.8 Geräte

Durchflusszytometer LSR II, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

ELISA-Messgerät SLT Spectra, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland

#### 4.1.9 Software

ELISA-Messung: Magellan, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland

Auswertung Durchflusszytometrie: FlowJo 8.1.1, Treestar Inc., Ashland, OR, USA

Statistische Auswertung: SPSS 14.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA

Tabellenkalkulation: Microsoft Excel; SigmaPlot 11.0, Systat Software

Textverarbeitung: Microsoft Word

Bildbearbeitung: Adobe Photoshop CS, Image J



## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Mäuse

Sechs bis acht Wochen alte C57BL/6-Wildtyp-Mäuse wurden von Charles River Laboratories, Research Models and Services GmbH, Sulzfeld, Deutschland, altersentsprechende *kit<sup>W-sh/W-sh</sup>*-Mäuse (Duttlinger et al. 1993) des C57BL/6-Stammes von der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, zur Verfügung gestellt. Adulte *kit<sup>W-sh/W-sh</sup>*-Mäuse zeichnen sich durch eine Mastzelldefizienz aus, welche auf eine verminderte Tyrosinkinase-Aktivität von c-Kit zurückzuführen ist (Grimbaldeston et al. 2005). Es können dennoch c-Kit-defiziente *bone marrow derived mast cells* (BMMCs) generiert werden. *Kit<sup>D814Vflox</sup>deleter-Cre* doppelt-transgene Mäuse (im Folgenden als *kit<sup>D814</sup>tg* bezeichnet) wurden von der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln bezogen. Durch das Cre/loxP-basierte transgene *kit<sup>D814Vflox</sup>*-Modell kann ein *kit*-Gen mit der aktivierenden *kit<sup>D814V</sup>*-Punktmutation (welche ein murines Homolog der häufigsten Mutation im Rahmen der humanen Mastozytose, *kit<sup>D816V</sup>*, darstellt), gesteuert über den *kit*-Promoter konditional exprimiert werden (Gerbaulet et al. 2010). Das Transgen wird in adulten Mäusen nach Cre-vermittelter Exzision des loxP-flankierten Elementes zur Termination der Transkription exprimiert. Auf diese Art und Weise sind aus induzierten *kit<sup>D814V</sup>tg*-Mäusen generierte BMMCs in der Lage, *kit<sup>D814V</sup>* zu exprimieren.

IL-33R-defiziente (im Folgenden als *il-33<sup>r/-</sup>* bezeichnet) Mäuse (Townsend et al., 2000) wurden über Dr. A. N. McKenzie (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Vereinigtes Königreich) bezogen und wie die entsprechenden BALB/c-Kontrollmäuse im Tierhaus des Universitätsklinikums Jena weitergezüchtet. Die Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Tierzucht sowie sämtliche Experimente wurden unter Einhaltung der entsprechenden Gesetze und Verordnungen des Freistaates Thüringen und der Bundesrepublik Deutschland sowie der Richtlinien des Universitätsklinikums Jena durchgeführt.

### 4.2.2 Zellkultur und Generierung von BMMCs

Zur Kultivierung der verwendeten Zelllinien und Primärzellen wurden mit Hilfe von Inkubatoren Bedingungen etabliert, die im Wesentlichen denen des menschlichen Körpers entsprechen (pH der Kulturmedien 7.4, CO<sub>2</sub> 5%, Humidität 95%, Temperatur

37°C). Um Infektionen der Zellen zu vermeiden, wurde unter einer Sterilwerkbank sowie mit desinfizierten bzw. autoklavierten Geräten gearbeitet. Medien und Lösungen wurden vor ihrer Verwendung hitzeinaktiviert bzw. sterilfiltriert und vor ihrer Verwendung auf 37°C vorgewärmt.

Zellen der Linie HMC-1 (zur Verfügung gestellt von Dr. J.H. Butterfield, Mayo Clinic) wurden aus einem an Mastzell-Leukämie erkrankten Patienten isoliert und zeichnen sich u.a. durch die aktivierende Punktmutation V560G der Juxtamembrandomäne von c-Kit aus. Durch das sich daraus ergebende SCF-unabhängige Wachstum ist diese Zelllinie sowohl einfach als auch preiswert zu kultivieren und eignet sich als Mastzell-Modell, beispielsweise für die Voruntersuchungen des Abschnittes 5.1 (Butterfield et al. 1988, Kanakura et al. 1994). Die Zellen wurden in RPMI-1640 (Zusätze: 10% FCS, 1% Antibiotika und 50 µM Mercaptoethanol) kultiviert und etwa alle 4-5 Tage mit frischem Medium gesplittet.

Die Generierung von BMMCs aus den entsprechenden Mausstämmen erfolgte zunächst durch Isolation des Knochenmarks aus Ober- und Unterschenkel der Mäuse: Der Knochen wurde mit IMDM (Zusätze: 10% FCS, 1% Antibiotika, 1% Glutamin, 50 µM Mercaptoethanol) durchgespült und anschließend aus diesem Medium eine Einzelzellsuspension angefertigt. Die darin enthaltenen Zellen wurden in mit IL-3 (10 ng/ml) versetztem IMDM kultiviert. Nach jeweils drei Tagen wurde diese Zellkultur zur Abtrennung der adhärenenten Zellen in eine neue Kulturflasche überführt. Anschließend erfolgte eine etwa vierwöchige Kultivierung, bis durchflusszytometrisch 98% c-Kit<sup>+</sup> FcεR<sup>+</sup> IL-33R<sup>+</sup> Zellen gemessen werden konnten. Bei BMMCs aus *kit<sup>W-sh/W-sh</sup>*-Mäusen konnte hingegen nur bei weniger als 2% der gemessenen Zellen c-Kit detektiert werden. Die BMMCs wurden anschließend in IMDM (Zusätze: 10% FCS, 1% Antibiotika, 1% Glutamin, 50 µM Mercaptoethanol) kultiviert und etwa alle 7 Tage nach Bedarf mit frischem Medium gesplittet.

#### 4.2.3 Zellstimulation und -lyse

Zur Durchführung von Stimulationsexperimenten wurden die Zellen in serumfreiem Medium (SFM) suspendiert, mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer quantitativ bestimmt und schließlich eine Zellsuspension von 10<sup>6</sup> Zellen/ml SFM angefertigt. Anschließend wurden die Zellen, sofern nicht anders angegeben, wie folgt ausgesät:

Western Blot:	1 ml pro Well einer 12-well-Platte (entspricht $10^6$ Zellen)
FACS:	500 $\mu$ l pro Well einer 24-well-Platte (entspricht $5 \times 10^5$ Zellen)
ELISA:	200 $\mu$ l pro Well einer 96-well-Platte (entspricht $2 \times 10^5$ Zellen)
Co-IP:	5 – 10 ml pro Kulturschale (entspricht $5 \times 10^6$ – $1 \times 10^7$ Zellen)

Nach dem Aussäen in SFM wurden die HMC-1-Zellen 24 Stunden, die BMMCs vier Stunden ausgehungert, wodurch ein Absinken und eine semiadhärente Ablagerung auf dem Plattenboden erreicht werden konnte.

Die in SFM ausgesäten Zellen wurden nach entsprechend angefertigten Stimulationsprotokollen mit Inhibitoren präinkubiert und mit Zytokinen stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 120  $\mu$ l Lysepuffer (s. Kap. 4.1.7.1) für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Der Lysepuffer bewirkt hierbei die Detergierung der Zellen, die Primärstruktur und der Phosphorylierungsstatus der zellulären Proteine hingegen werden durch Protease- und Phosphorylase-Inhibitoren konserviert.

Das gewonnene Lysat wurde durch Zentrifugieren (13.000 rpm, 4°C, 5 min) von seinen zellulären Bestandteilen getrennt. Bei der Anfertigung von Lysaten für Caspase-3-Spaltungs-Blots erfolgte zusätzlich vor der Zentrifugation eine Sonifizierung, um somit die Caspase-3 als nukleäres Protein aus dem Zellkern freizusetzen.

#### **4.2.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Proteine in den hergestellten Zelllysaten wurden mit Hilfe selbst gegossener SDS-Polyacrylamid-Gele elektrophoretisch entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, wobei das Polyacrylamid als Trennmedium dient und SDS als anionisches Detergens die Eigenladung der Proteine maskiert. Als Laufpuffer wurde eine Tris-Glycin-Lösung mit zugesetztem SDS verwendet (s. Kap. 4.1.7.2).

Die Zelllysate wurden zunächst zur Denaturierung der enthaltenen Proteine jeweils mit Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht. Anschließend erfolgte die Beladung der Gele. Weiterhin wurde ein Proteingrößenstandard aufgetragen. In der Regel wurde pro nachzuweisendem Protein ein Gel beladen. Die

eigentliche Auftrennung der Proteine erfolgte durch das Anlegen einer Spannung von 150 Volt für einen Zeitraum von etwa 60 Minuten.

#### 4.2.5 Western Blot

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine spezifisch nachweisen zu können, ist zunächst deren Übertragung aus den Gelen auf Nitrocellulose-Membranen mittels Western Blotting notwendig. Dazu wurden Gel und Membran zwischen jeweils drei in Transferpuffer eingeweichten Filterpapieren eingebettet, der eigentliche Proteintransfer wurde mittels Anlegen einer Spannung von 15 Volt für zwei Stunden durchgeführt.

Danach erfolgte die Waschung der Membranen mit TBST (3 x 5 min) und die Inkubation in einer entsprechenden Blocklösung (5% TM/TBST) für zwei Stunden. Nach erneutem Waschen (3 x 5 min) wurden die Membranen über Nacht mit dem primären, gegen das nachzuweisende Protein gerichteten Antikörper, inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen zunächst erneut gewaschen (3 x 5 min), um anschließend mit dem Sekundärantikörper, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet und mit *horse raddish peroxidase* (HRP) gekoppelt ist, für mindestens 2h inkubiert zu werden.

Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Membranen erneut gewaschen (3 x 10 min) und danach eine Lösung aus Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Luminol (ECL-Detektions-Kit) auf die Membranen aufgetragen (pro Membran 1 ml).

Mittels der an den Sekundärantikörper gekoppelten HRP und  $H_2O_2$  wird Luminol oxidiert, durch dessen Photoemission wiederum ein aufgelegter Film belichtet wird. Das emittierte Signal entspricht dabei dem im Zelllysate nachzuweisendem Protein und kann nun qualitativ und quantitativ ausgewertet werden.

#### 4.2.6 Densitometrische Auswertung

Die Bandendichte der Blotsignale wurde mit der Software Image J gemessen, wobei jeweils die Bandendichte des Hintergrundes desselben Blots im nächsten Schritt subtrahiert wurde. Die daraus resultierenden Werte wurden durch die Werte der entsprechenden Tubulin-Blots dividiert. Die auf diese Weise errechneten normalisierten Werte wurden in Bezug zueinander gestellt. Der normalisierte Wert der Kontrolle jedes gemessenen phosphorylierten Proteins betrug dabei eins.

#### 4.2.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die nach entsprechendem Stimulationsprotokoll gewonnenen Überstände wurden mittels ELISA quantitativ auf freigesetzte Zytokine untersucht.

Dazu wurde am Tag 1 eine MaxiSorp 96-Well-Platte mit einem im Verhältnis 1:200 in Beschichtungspuffer gelösten *coating*-Antikörper beschichtet (50 µl pro Well) und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am Tag 2 wurde die Platte zunächst 3-mal (100 µl/200 µl/100 µl TBST pro Well) gewaschen und anschließend mit 50 µl 1% BSA/PBS-Lösung pro Well für 90 Minuten bei Raumtemperatur (RT) geblockt. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte eine erneute dreimalige Waschung. Im nächsten Schritt wurden die Proben sowie der jeweilige Standard den Herstellerangaben entsprechend aufgetragen und für 90 Minuten bei RT inkubiert. Danach erfolgten erneut drei Waschungen sowie das Auftragen der biotinylierten Antikörper (1:200 in 1% BSA/PBS, 50 µl pro Well), die Inkubationszeit betrug ebenfalls 90 Minuten bei RT. Nach 3-fachem Waschen wurde pro Well 100 µl Streptavidin-POD (1:5000 in 0.2% BSA/PBS) aufgetragen und für 90 Minuten bei RT inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte erneutes 3-faches Waschen und im Anschluss zur Farbstoffreaktion die Zugabe von 100 µl/Well Citrat-Phosphat-Puffer (mit 0,1% OPD und 0,00025% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Die Farbstoffreaktion wurde nach etwa 45 Minuten durch die Zugabe von 100 µl/Well 1.5 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) beendet. Die photometrische Messung erfolgte mit dem Gerät SLT Spectra (Filter 492 nm) und der Software Magellan.

#### 4.2.8 Co-Immunopräzipitation

Mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation können Protein-Protein-Wechselwirkungen spezifisch nachgewiesen werden. Dabei wird mittels eines Antikörpers ein Antigen, i.d.R. ein zelluläres Protein, sowie zusätzlich ein weiteres Protein als Interaktionspartner des Ersteren aus einem vorher angefertigten Zelllysate herauspräzipitiert. Dieser Proteinkomplex kann anschließend mittels Western Blot dargestellt werden.

Die Zelllysate wurden zunächst mit jeweils 20 µl des Antikörpers M14 (s. Kap. 4.1.4.1), welcher gegen c-Kit gerichtet ist, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde Sepharose (100 µl / Probe) 3-mal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen (Zentrifugation: 1 min, 13.400 rpm), anschließend mit den Lysaten zusammengeführt

und für vier Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Sepharose-Beads abgetrennt, mit jeweils 50 µl Probenpuffer (s. Kap. 4.1.7.3) versetzt und bei 95 °C aufgekocht. Durch Zentrifugation (1 min, 13.400 rpm) wurde schließlich die Sepharose abgetrennt. In den nächsten Schritten wurden die Proben per SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membranen geblottet und mittels ECL-Reaktion dargestellt (s. Kap. 4.2.4 und 4.2.5).

#### 4.2.9 Durchflusszytometrie

In Lösung befindliche Einzelzellen können mit Hilfe der Durchflusszytometrie gezählt und charakterisiert werden. Das Prinzip dieser Untersuchung basiert auf der Emission von optischen Signalen durch Zellen, wenn diese einzeln einen Laserstrahl passieren. Dabei wird der Laser gestreut, wobei das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter channel*) mit dem Zellvolumen, das Seitwärtsstreulicht (SSC, *sidewards scatter channel*) mit der Granularität der Zellen korreliert. Zur Darstellung von Zellen mit bestimmten Oberflächenproteinen werden diese mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Bei Passage des Lasers werden diese Fluorochrome angeregt und emittieren dabei Licht einer spezifischen Wellenlänge, welches wiederum im Sensormodul des Gerätes detektiert wird.

Die nach Protokoll stimulierten Zellen wurden zunächst durch Zentrifugieren (1352xg) von ihrem Medium abgetrennt und anschließend jeweils in 4 ml PBA resuspendiert. Da in der Regel drei unterschiedliche Oberflächenmoleküle (IL-33R, IL-1RAcP, c-Kit) angefärbt und aus der Kontrollprobe 1 ml ungefärbt belassen wurden, erfolgte im nächsten Schritt die Aufteilung dieser Proben auf vier Messröhrchen zu jeweils 1 ml. Daraufhin wurden diese jeweils mit 3 ml PBA gewaschen, zentrifugiert und mit 2 µl/Probe humanem γ-Globulin für ca. 8 min geblockt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der spezifischen Antikörper gegen IL-33R, IL-1RAcP und c-Kit (s. Kap. 4.1.4.1), welche für 30 min auf Eis inkubiert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die mit anti-IL-33R-AK und anti-IL-1RAcP-AK versetzten Proben mit Phycoerythrin gekoppeltem Streptavidin (1:1000) für 15 min inkubiert (der anti-c-Kit-AK ist bereits mit dem Fluorochrom Allophycocyanin gekoppelt). Anschließend erfolgte eine weitere Waschung (3 ml PBA/Probe) und Zentrifugation, bevor im letzten Schritt die Proben mit dem Durchflusszytometer gemessen wurden.

#### 4.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 14.0. Zunächst wurden die Daten mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests bzw. des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung geprüft. War eine Normalverteilung gegeben, wurde zur Prüfung auf statistische Signifikanz der *Students* t-Test angewandt (festgelegtes Signifikanzniveau  $p < 0.05$  bzw. 5%). Lag keine Normalverteilung vor, erfolgte die Signifikanzprüfung mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests (festgelegtes Signifikanzniveau  $p < 0.05$  bzw. 5%). Ein Test auf statistische Signifikanz wurde jeweils mit der Fragestellung des entsprechenden Versuchs abgeglichen. Die Darstellung der erhobenen Daten als Diagramm erfolgte mit Microsoft Excel sowie mit SigmaBlot 11.0 als Mittelwerte mit Standardfehlern. Sowohl die Anzahl der Wiederholungen des jeweiligen Versuchs als auch die Anzahl der Bestimmungen sind in den Legenden der entsprechenden Abbildungen vermerkt.

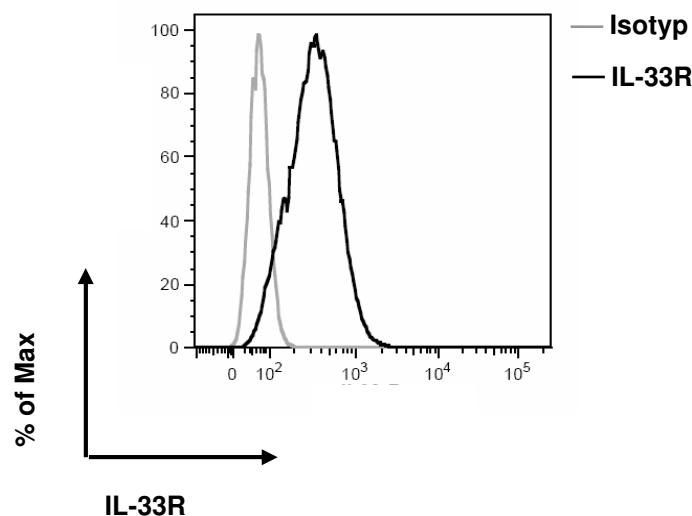
## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Voruntersuchungen: Src-Kinasen und die Signaltransduktion des IL-33-Rezeptors in HMC-1-Zellen

#### 5.1.1 Charakterisierung von IL-33-induzierten Signalwegen

Die durch den IL-33-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion und deren Abhängigkeit von Src-Kinasen wurden zunächst an HMC-1-Zellen untersucht. Zellen dieser Linie exprimieren neben einer konstitutiv aktiven Mutante des SCF-Rezeptors c-Kit (s. Kap. 4.2.2) den IL-33-Rezeptor auf ihrer Oberfläche und können daher mit IL-33 stimuliert werden (s. Abb. 3)

Bezug nehmend auf Ergebnisse früherer Publikationen über die IL-33R-Signaltransduktion (Schmitz et al. 2005, Ikura et al. 2007) wurde anhand der



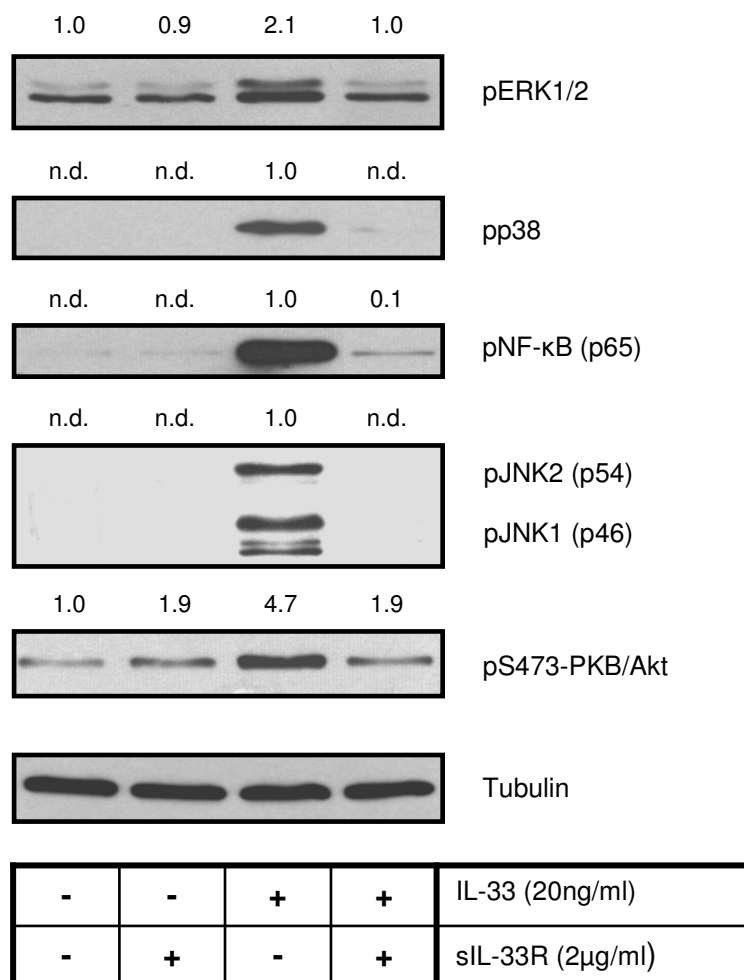
**Abb. 3: Die Expression des IL-33-Rezeptors auf HMC-1-Zellen.**

Die Oberflächenexpression des IL-33R wurde mittels FACS gemessen.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden für 24h in SFM ausgesät und anschließend mittels gekoppeltem anti-IL-33R-AK gefärbt (schwarze Linie). Die entsprechende Isotypen-Kontrolle ist als graue Linie dargestellt.



Phosphorylierung von intrazellulären Signalproteinen wie ERK1/2, JNK1/2, p38, NF- $\kappa$ B und PKB/Akt zunächst die IL-33R-spezifische Signalweiterleitung in HMC-1-Zellen untersucht.

Die Stimulation mit IL-33 führte zu einer signifikanten Phosphorylierung von ERK1/2, JNK1/2, p38, NF- $\kappa$ B und PKB/Akt im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (s. Abb. 4). Die optimale Zytokinkonzentration und Stimulationszeit wurden durch entsprechende Voruntersuchungen ermittelt (Daten nicht gezeigt). Der Spezifitätsnachweis der IL-33-vermittelten Proteinaktivierung erfolgte mit Hilfe des löslichen IL-33-Rezeptors (sIL-33R), welcher als *decoy*-Rezeptor die Bindung von IL-33 an dessen membranständigen Rezeptor verhindert (Hayakawa et al. 2007). Die Präinkubation von HMC-1-Zellen mit sIL-33R und nachfolgender IL-33-Stimulation führte zu einer nahezu vollständigen Blockierung der IL-33R-vermittelten Aktivierung der oben genannten Signalproteine (s. Abb. 4). Somit konnte gezeigt werden, dass diese Aktivierung durch eine spezifische IL-33-/IL-33R-Interaktion induziert wurde.

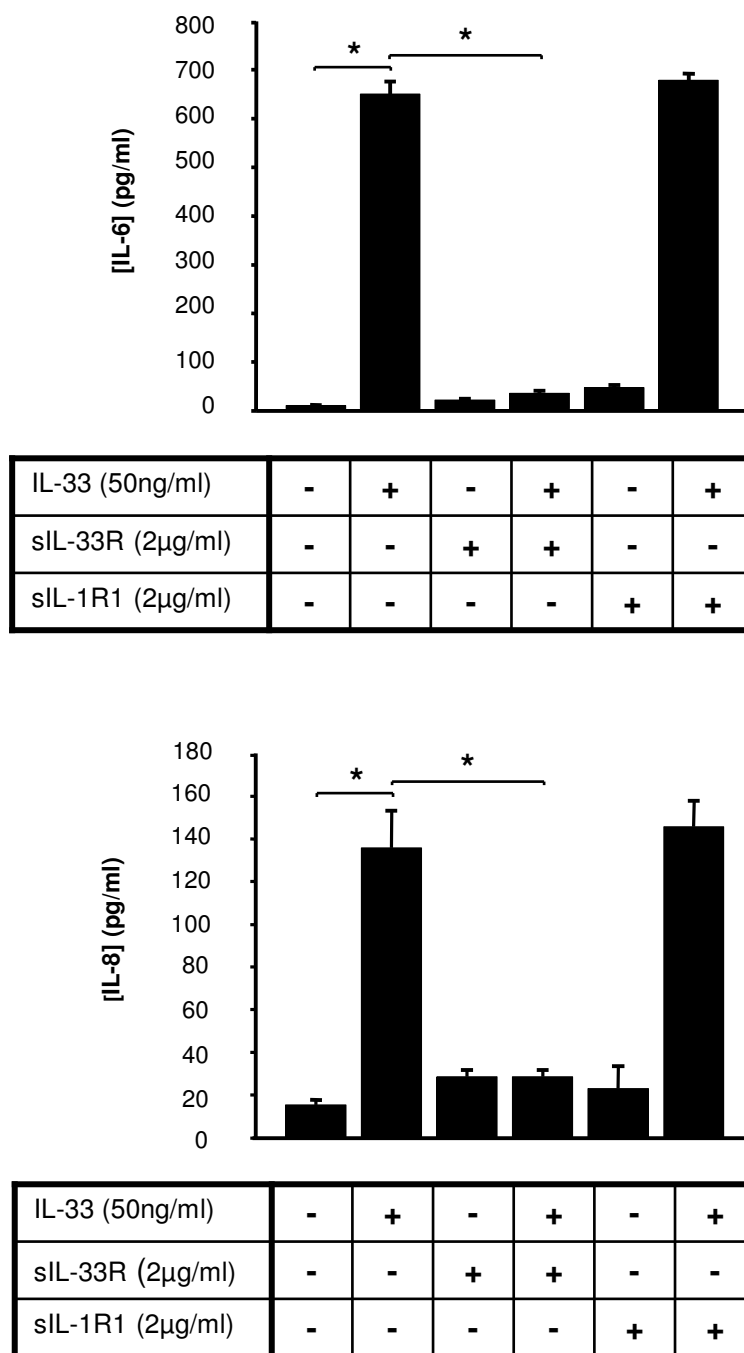


**Abb. 4: Die spezifische Aktivierung von Signalwegen in HMC-1-Zellen durch IL-33.**

Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in SFM ausgesät und nach 24h mit sIL-33R in der angegebenen Konzentration für 30min inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit IL-33 für 20min. Nach Lyse der Zellen wurden die zellulären Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und der Phosphorylierungssatus der angegebenen Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert. Als Auftragskontrolle ist Tubulin abgebildet. Diese Abbildung zeigt repräsentativ das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

### 5.1.2 Charakterisierung der IL-33-induzierten Zytokinsekretion

Zur Charakterisierung der Bedeutung der IL-33R-vermittelten Signaltransduktion für die Effektorfunktionen von Mastzellen eignet sich der Nachweis von freigesetzten Zytokinen mittels ELISA. Frühere Publikationen berichteten bereits von einer Freisetzung diverser Zytokine und Entzündungsmediatoren aus Mastzellen nach IL-33-Stimulation (Moulin et al. 2007, Ho et al. 2007, Iikura et al. 2007). Daher wurde im nächsten Schritt die Sekretion der beiden proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 aus HMC-1-Zellen untersucht. Der Nachweis der IL-6- und IL-8-Freisetzung erfolgte mittels spezifischem ELISA und zeigte nach Stimulation mit IL-33 eine im Vergleich zur Kontrolle starke und statistisch signifikante Zunahme der Freisetzung der beiden untersuchten Zytokine (s. Abb. 5). Durch den erneut mit sIL-33R durchgeführten Spezifitätsnachweis konnte die Freisetzung von IL-6 und IL-8 nahezu vollständig inhibiert werden. Die Inkubation mit dem löslichen IL-1-Rezeptor (sIL-1R1) führte hingegen nicht zur Inhibierung der IL-6- bzw. der IL-8-Sekretion (s. Abb. 5).



**Abb. 5: Die IL-33-induzierte Zytokinsekretion durch HMC-1-Zellen.**

Jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in SFM ausgesät und nach 24 Stunden mit sIL-33R bzw. sIL-1R1 in den angegebenen Konzentrationen für 30min inkubiert und anschließend für 24h mit IL-33 stimuliert. In den Überständen wurden IL-6 und IL-8 mittels ELISA gemessen. Bei den Experimenten handelt es sich jeweils um eine 3-fach-Bestimmung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. \* $p < 0.05$

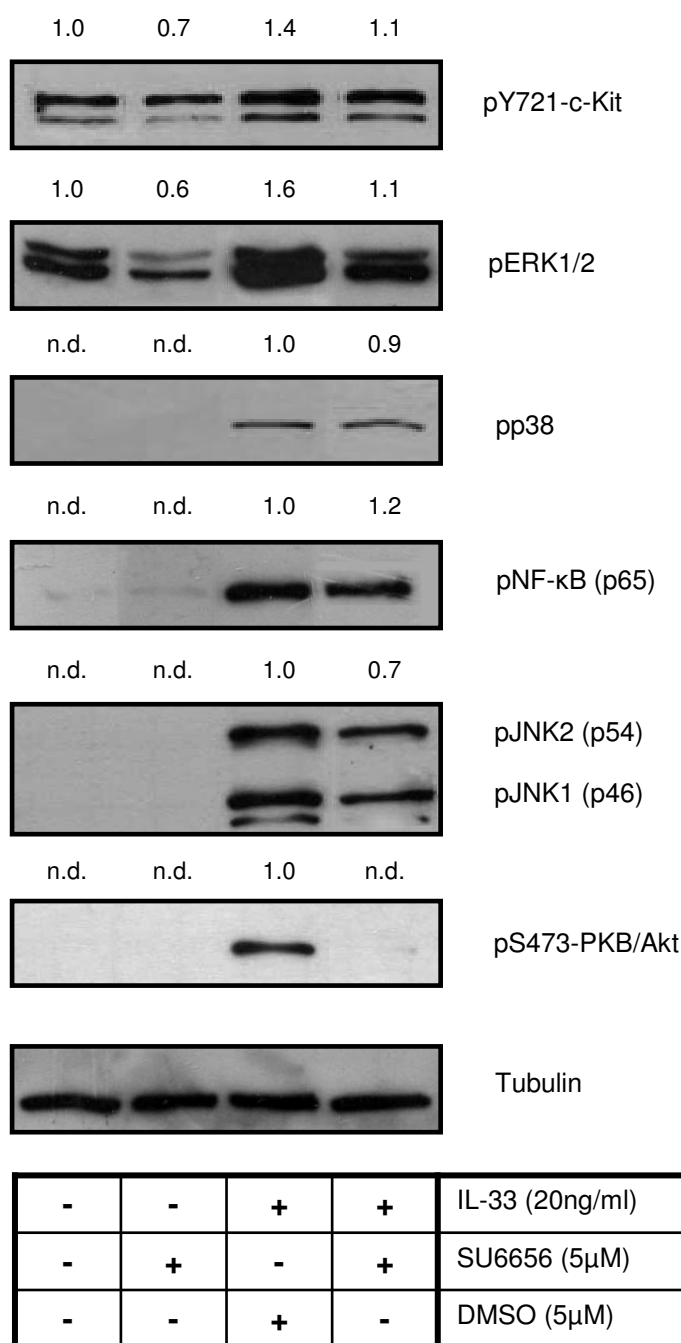
### 5.1.3 Die Bedeutung von Src-Kinasen für IL-33-induzierte Signalwege

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Stimulation von HMC-1-Zellen mit IL-33 neben der Aktivierung der o.g. Signalproteine auch zur Phosphorylierung von Tyrosinresten der Rezeptortyrosinkinase c-Kit führt und die biologische Funktion von IL-33 bzw. seines Rezeptors in Mastzellen von einer Aktivierung von c-Kit abhängig ist (Drube et al. 2010). Die genauen Mechanismen dieser Interaktion zwischen dem IL-33-Rezeptor und c-kit konnten jedoch bis dato nicht geklärt werden. Da Src-Kinasen eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion von c-Kit spielen (s. Kap. 2.4), soll nun deren Einfluss auf die Signaltransduktion von IL-33 sowie dessen Konsequenzen für die biologische Funktion von Mastzellen untersucht werden.

Der Einfluss von Src-Kinasen auf die IL-33R-vermittelte Signaltransduktion sowohl in Zellen der Mastzelllinie HMC-1 als auch in späteren Versuchen in primären, aus Knochenmark generierten murinen Mastzellen ist pharmakologisch mit Hilfe des Src-Kinase-Inhibitors SU6656 (s. Kap. 4.1.3) untersucht worden. SU6656 ist in der Lage, diverse Mitglieder aus der Gruppe der Src-Tyrosinkinasen wie Src, Yes, Fyn und Lyn bereits bei niedrigen Dosierungen zu inhibieren, während andere Tyrosinkinasen wie Abl, PDGFR, FGFR oder IGF-1R erst durch hohe Konzentrationen inhibiert werden (Blake et al. 2000).

Um zu ermitteln, welche Signalwege SU6656-sensitiv und damit abhängig von Src-Kinasen sind, wurden HMC-1-Zellen mit SU6656 präinkubiert und anschließend mit IL-33 stimuliert. Wie in Abb. 6 zu sehen ist, führte die Inkubation mit SU6656 zunächst zu einer Inhibierung der in HMC-1-Zellen erhöhten Basalaktivität von c-Kit (entspricht der Autophosphorylierung des Tyrosinrests 721 [pY721-c-Kit]) und ERK1/2. Des Weiteren konnten eine deutliche Verminderung der Aktivierung von ERK1/2 und PKB/Akt sowie eine moderate Verminderung der Aktivierung von pY721-c-Kit und JNK1/2 nach Stimulation mit IL-33 beobachtet werden. Die IL-33R-vermittelte Aktivierung von p38 und NF- $\kappa$ B ist nicht SU6656-sensitiv und damit nicht von Src-Kinasen abhängig.

Diese Ergebnisse zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in HMC-1-Zellen die IL-33R-induzierte Aktivierung von c-Kit, ERK1/2, JNK1/2 und PKB/Akt durch Src-Kinasen vermittelt werden, während die Aktivierung von p38 und NF- $\kappa$ B unabhängig von Src-Kinasen erfolgt.



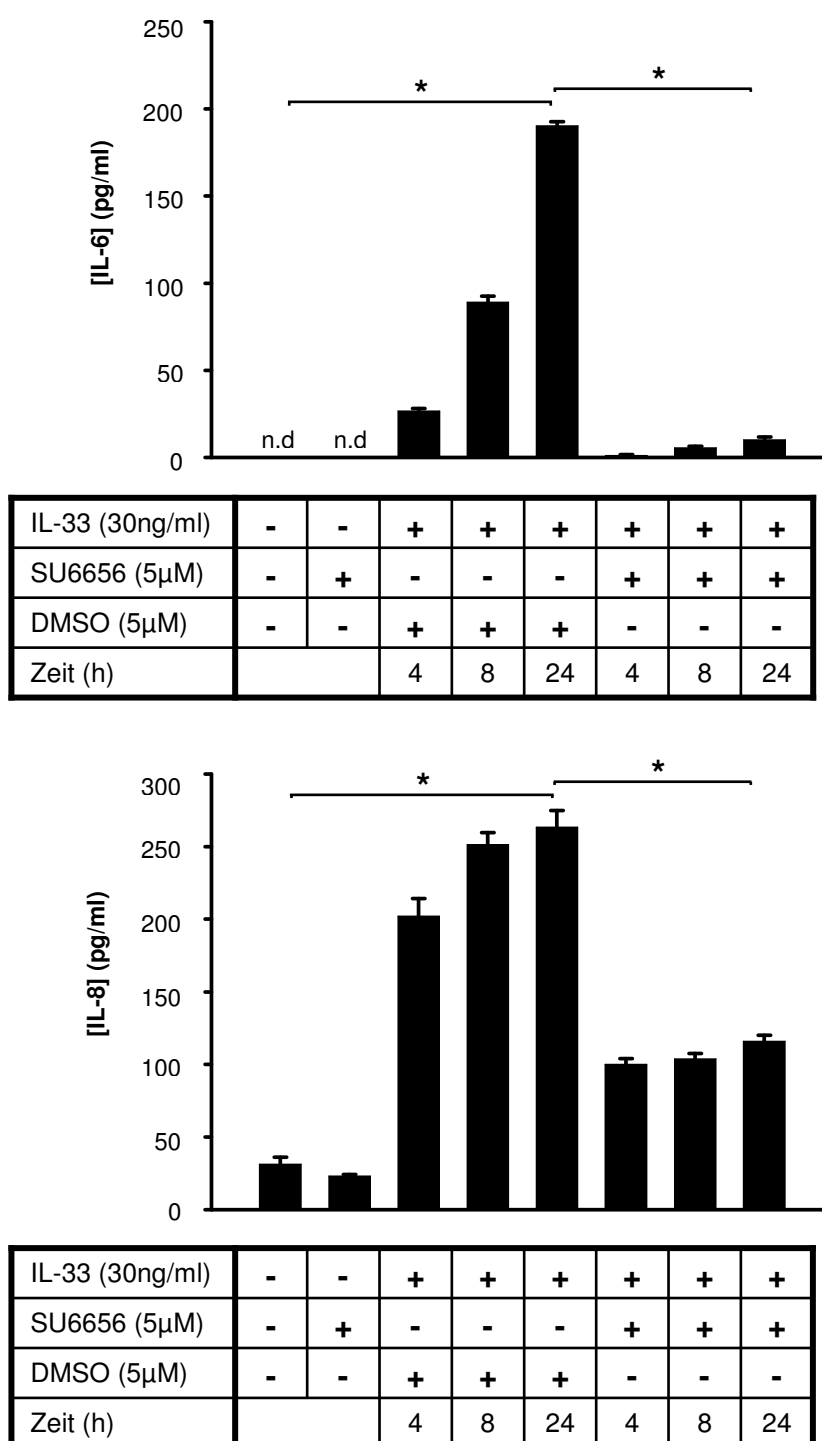
**Abb. 6: Src-Kinasen sind Bestandteil der IL-33-vermittelten Signaltransduktion.**

Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in SFM ausgesät und nach 24h mit SU6656 bzw. DMSO in der angegebenen Konzentration für 30min präinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit IL-33 für 20min. Nach Lyse der Zellen wurden die zellulären Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und der Phosphorylierungssatus der angegebenen Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert. Als Auftragskontrolle ist Tubulin abgebildet. Die Abbildung zeigt repräsentativ das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

#### **5.1.4 Die Bedeutung von Src-Kinasen für die IL-33-induzierte Zytokinsekretion**

Der Einfluss von Src-Kinasen auf die biologische Wirkung von IL-33 in HMC-1-Zellen wurde anhand der IL-6- und IL-8-Freisetzung mittels ELISA untersucht. Eine Präinkubation mit SU6656 bewirkte eine nahezu vollständige Blockierung der IL-6-Sekretion nach 4-, 8- und 24-stündiger Stimulation mit IL-33 und führte ebenso zu einer signifikanten Reduzierung der IL-8-Sekretion nach identischen Stimulationszeiten (s. Abb. 7).

Um auszuschließen, dass die Hemmung der Zytokinsekretion auf einer eventuellen proapoptotischen Wirkung von SU6656 beruht, wurde mittels Westernblot die Caspase-3-Spaltung nach 24-stündiger Inkubation mit SU6656 untersucht. Da keine erhöhte Caspase-3-Spaltung im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachgewiesen wurde, ist ein möglicher proapoptotischer Effekt von SU6656 unwahrscheinlich (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 7: Die IL-33-induzierte Sekretion von IL-6 und IL-8 wird durch Src-Kinasen vermittelt.**

Jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in SFM ausgesät und nach 24 Stunden mit SU6656 bzw. DMSO in den angegebenen Konzentrationen für 30min präinkubiert und anschließend in den angegebenen Zeiträumen mit IL-33 stimuliert. In den Überständen wurden IL-6 und IL-8 mittels ELISA gemessen. Bei den Experimenten handelt es sich jeweils um eine 3-fach-Bestimmung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. \* $p < 0.05$



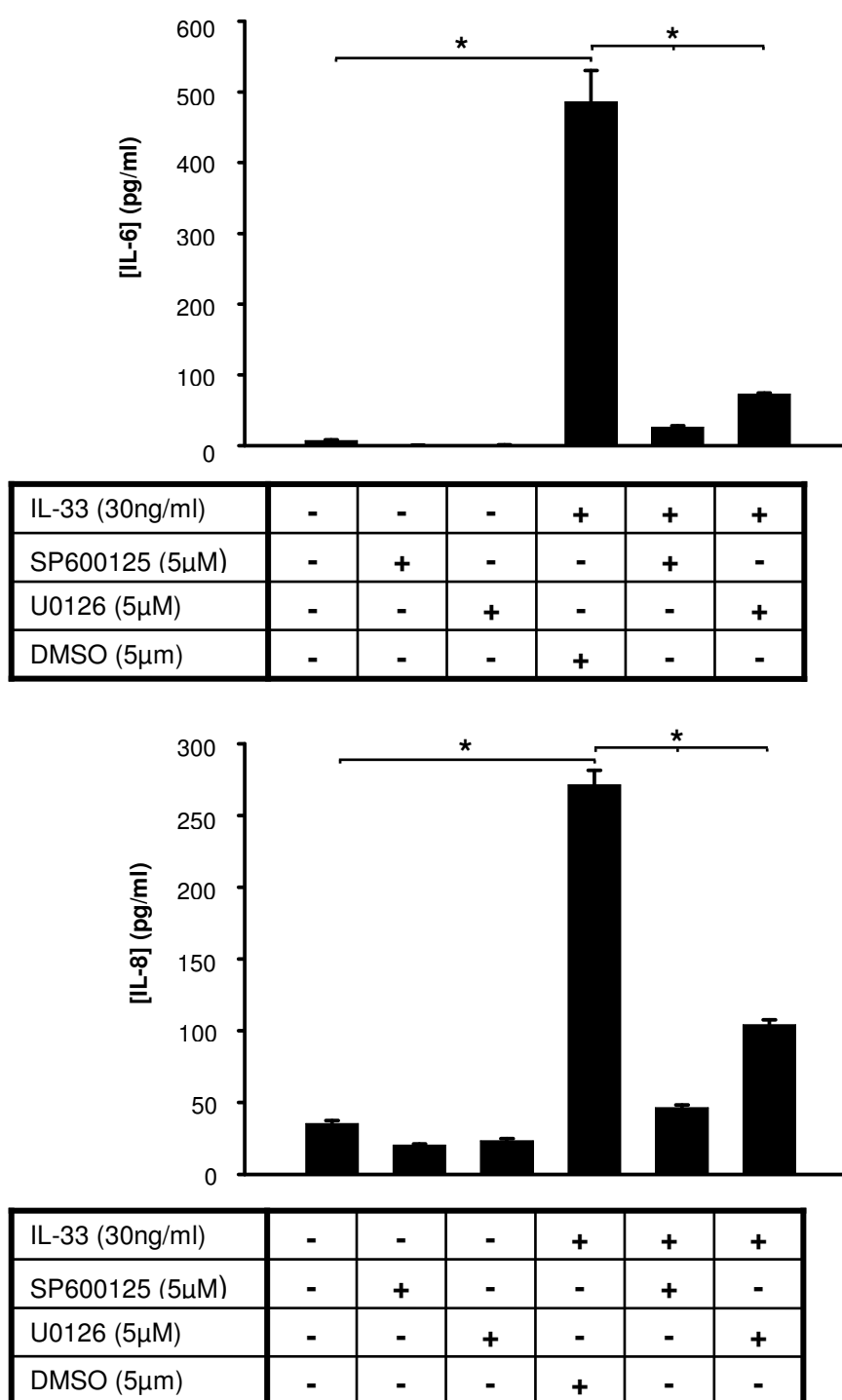
### **5.1.5 Von Src-Kinasen abhängige und unabhängige Signalwege und deren Einfluss auf die IL-33-induzierte Zytokinsekretion**

In Kap. 5.1.3 konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von ERK1/2 und JNK1/2 nach Stimulation mit IL-33 durch Src-Kinasen vermittelt wird, während im Gegensatz dazu p38 und NF- $\kappa$ B unabhängig von Src-Kinasen aktiviert werden. Aus diesem Grund sollte in den folgenden Untersuchungen der Einfluss Src-Kinase-abhängiger Signalwege auf die IL-33-induzierte Zytokinsekretion ermittelt werden.

Dazu wurden HMC-1-Zellen mit spezifischen Inhibitoren (s. Kap. 4.1.3) von ERK1/2 (U0126, Newton et al. 2000) und JNK1/2 (SP600125, Bennett et al. 2001) präinkubiert, anschließend für 24h mit IL-33 stimuliert und die Freisetzung von IL-6 und IL-8 mittels ELISA gemessen. Die Inkubation der Zellen mit U0126 und SP600125 vor einer Stimulation mit IL-33 führte zu einer signifikanten Reduktion sowohl der IL-6- als auch der IL-8-Sekretion im Vergleich zu den mit DMSO präinkubierten und mit IL-33 stimulierten Zellen (s. Abb. 8).

Die von Dr. Sebastian Drube aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen mit Inhibitoren gegen die von Src-Kinasen unabhängigen Signalproteine p38 (de Laszlo et al. 1998) und NF- $\kappa$ B (Tobe et al. 2003) zeigten nach entsprechender Inkubation vor 24-stündiger Stimulation mit IL-33 ebenfalls eine signifikante Reduktion der Freisetzung von IL-6 und IL-8 (Daten nicht gezeigt).

Durch die Präinkubation mit Inhibitoren gegen ERK1/2, JNK1/2, p38 sowie NF- $\kappa$ B konnte die IL-33-induzierte Freisetzung von IL-6 und IL-8 aus HMC-1-Zellen signifikant vermindert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl durch Src-Kinasen vermittelte (ERK1/2, JNK1/2) als auch von Src-Kinasen unabhängige Signalwege (p38, NF- $\kappa$ B) in HMC-1-Zellen für die IL-33R-vermittelte Zytokinsekretion von Bedeutung sind.



**Abb. 8: ERK und JNK vermitteln die IL-33-induzierte Sekretion von IL-6 und IL-8.**

Jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in SFM ausgesät und nach 24 Stunden mit SP600125 und U0126 bzw. DMSO in den angegebenen Konzentrationen für 30min präinkubiert und anschließend für 24h mit IL-33 stimuliert. In den Überständen wurden IL-6 und IL-8 mittels ELISA gemessen. Bei den Experimenten handelt es sich jeweils um eine 3-fach-Bestimmung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. \* $p < 0.05$

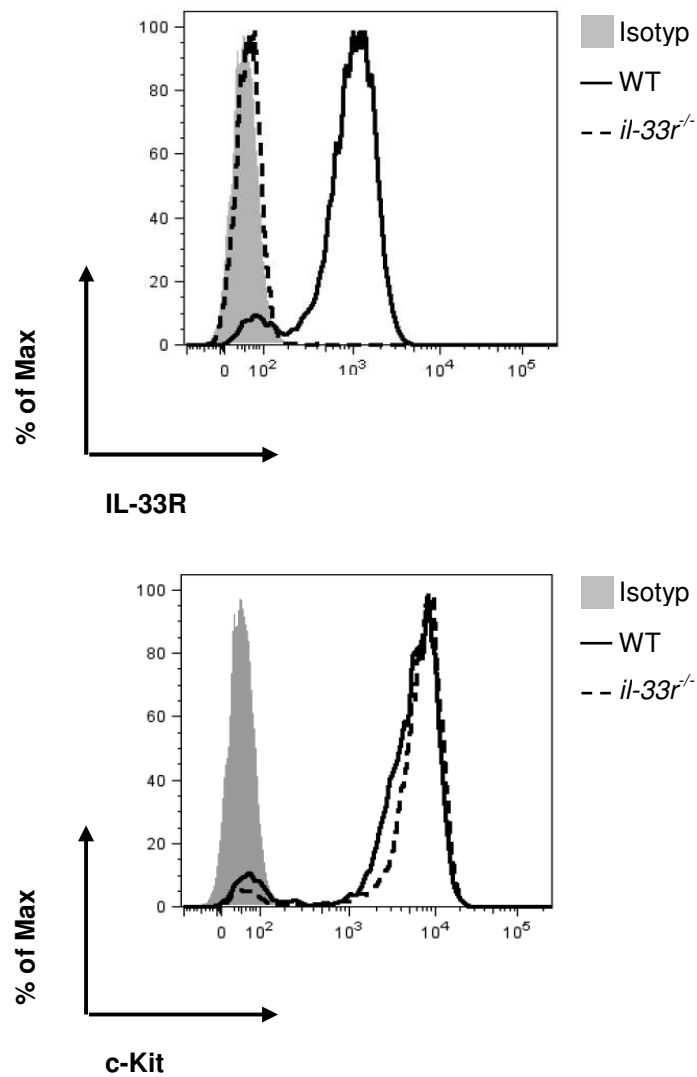
## 5.2 Src-Kinasen und die Signaltransduktion des IL-33-Rezeptors in primären Mastzellen

Die Voruntersuchungen mit der Zelllinie HMC-1 zeigten, dass wichtige, durch IL-33-/IL-33R-Interaktionen vermittelte Signalwege von Src-Kinasen induziert werden. HMC-1-Zellen zeichnen sich u.a. durch eine konstitutiv aktive Mutante der Rezeptortyrosinkinase c-Kit aus (s. Kap. 5.1). Da aktuelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe belegen, dass die Signaltransduktion des IL-33-Rezeptors und die daraus folgende Zytokinsekretion in Mastzellen von aktiviertem c-Kit abhängig sind (Drube et al. 2010) und Src-Kinasen eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion von c-Kit spielen (s. Kap. 2.4), wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Aktivierung von c-Kit Ursache bzw. Bedingung für die Involvierung von Src-Kinasen in das IL-33R-Signaling ist.

Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen über den Einfluss von Src-Kinasen auf IL-33R-vermittelte Signalwege galt es nun auf *in vitro* ausdifferenzierte Mastzellen zu übertragen und gegebenenfalls Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten in den untersuchten Signaltransduktionsprozessen im Vergleich zur HMC-1-Zelllinie zu eruieren. Zu diesem Zweck wurde mit aus Knochenmark von Wildtyp-(WT-) sowie aus *kit*<sup>D814V</sup>-transgenen Mäusen kultivierten Mastzellen (engl. *bone marrow derived mast cells*, BMMCs) gearbeitet.

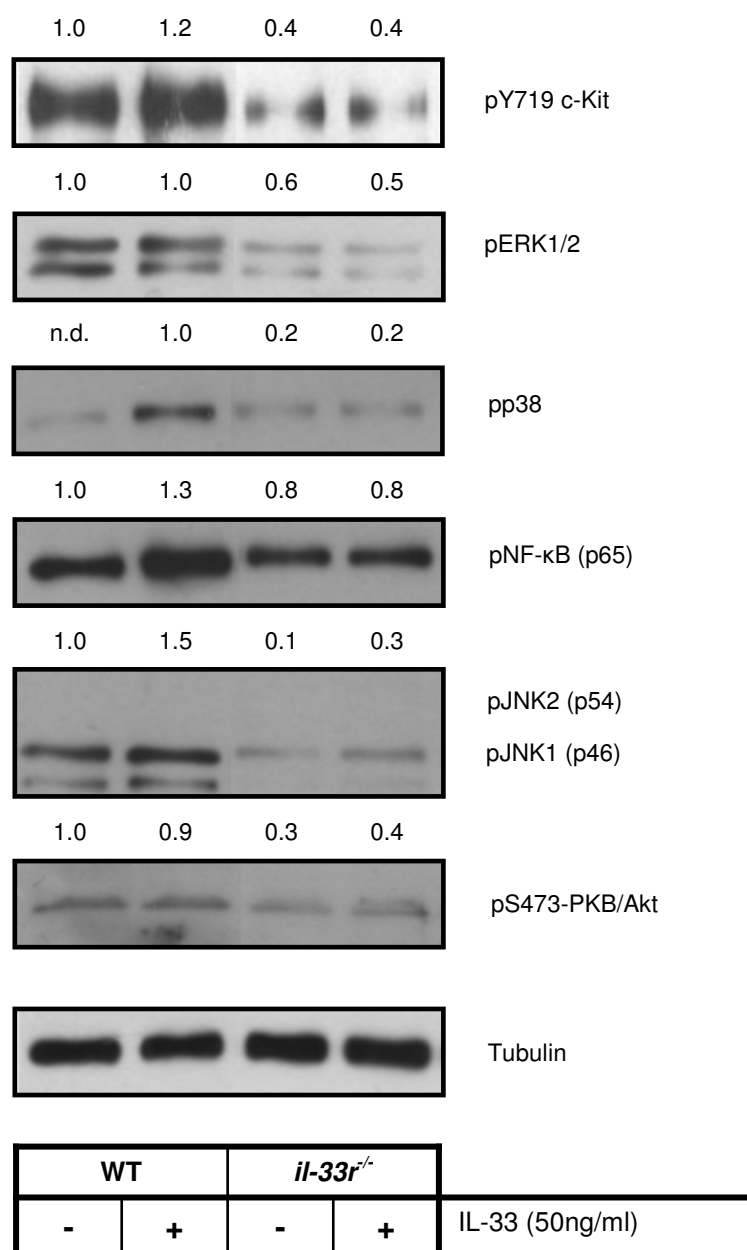
### 5.2.1 *il-33*<sup>-/-</sup>-BMMCs: Spezifitätsnachweis der IL-33-/IL-33R-Interaktionen

Zum Spezifitätsnachweis der in den folgenden Kapiteln beschriebenen IL-33-vermittelten Proteinaktivierung und Zytokinsekretion wurden BMMCs aus *il-33*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit IL-33 stimuliert. *il-33*<sup>-/-</sup>-BMMCs zeigten in den durchflusszytometrischen Untersuchungen zwar eine im Vergleich zu WT-BMMCs äquivalente Expression von c-Kit, jedoch wie erwartet keine Expression des IL-33R (s. Abb. 9). Die Stimulation von *il-33*<sup>-/-</sup>-BMMCs führte im Vergleich zu WT-BMMCs zu keiner signifikanten Aktivierung von Y719-c-Kit, ERK1/2, JNK1/2, PKB/Akt, NF-κB und p38 (s. Abb. 10). Dementsprechend sezernierten WT-BMMCs, nicht jedoch *il-33*<sup>-/-</sup>-BMMCs IL-6 nach Stimulation mit IL-33 (s. Abb. 11). Durch die Ergebnisse dieser Untersuchungen kann ausgeschlossen werden, dass die Aktivierung von Signalproteinen sowie die Induktion der IL-6-Sekretion bei BMMCs auf eine mögliche Endotoxinkontamination der IL-33-Zubereitung zurückzuführen ist.



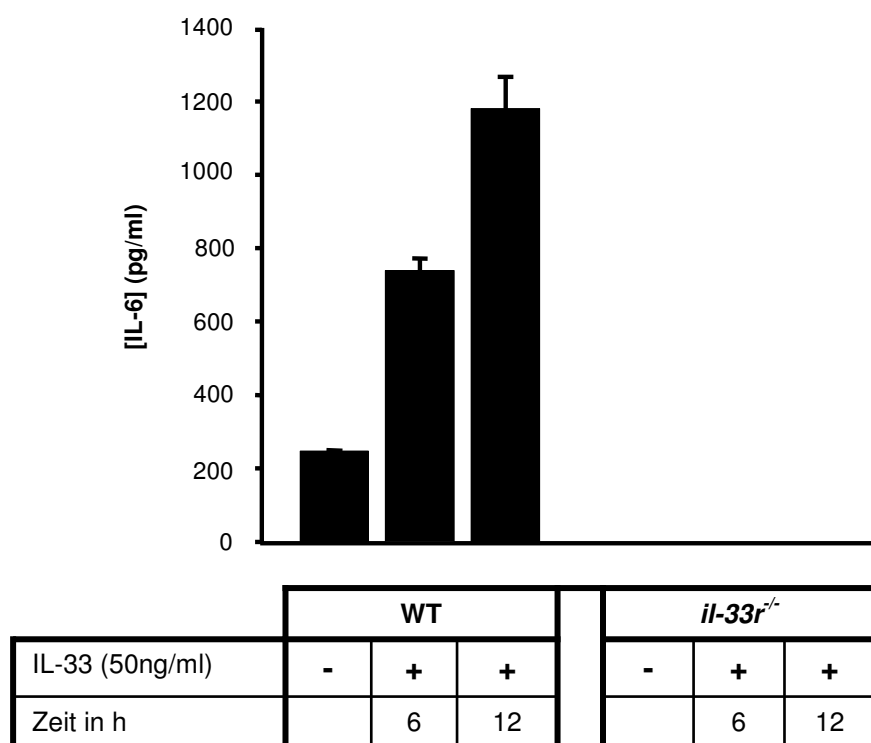
**Abb. 9: Vergleich der Expression von IL-33R und c-Kit zwischen WT-BMMCs und *il-33<sup>-/-</sup>*-BMMCs.**

Die Oberflächenexpression von c-Kit und des IL-33R auf WT-BMMCs (schwarze Linie) und *il-33<sup>-/-</sup>*-BMMCs (gestrichelte Linie) wurde mittels FACS gemessen. 5 x 10<sup>5</sup> Zellen wurden für 24h in SFM ausgesät und anschließend mittels gekoppeltem anti-IL-33R-AK bzw. anti-c-Kit-AK gefärbt. Die entsprechende Isotypen-Kontrolle ist als graue Fläche dargestellt.



**Abb. 10: *il-33*<sup>-/-</sup>-BMDCs sind nicht durch IL-33 stimulierbar.**

Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in SFM ausgesät und nach 24h für 20min mit IL-33 in der angegebenen Konzentration stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden die zellulären Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und der Phosphorylierungsstatus der angegebenen Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert. Als Auftragskontrolle ist Tubulin abgebildet. Die Abbildung zeigt repräsentativ das Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.



**Abb. 11: Die Stimulation von *il-33*<sup>-/-</sup>-BMMCs mit IL-33 induziert keine IL-6-Sekretion.**

Jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in SFM ausgesät und nach 24 Stunden mit IL-33 in der angegebenen Konzentration für 6h bzw. 12h stimuliert. Die Kostimulation erfolgte, indem die Zellen zunächst für 30min mit SCF prästimuliert wurden. In den Überständen wurde IL-6 mittels ELISA gemessen. Bei den Experimenten handelt es sich jeweils um eine 3-fach-Bestimmung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler.

### 5.2.2 Analyse der Rolle von c-Kit mittels *kit<sup>D814V</sup>*-transgenen BMMCs

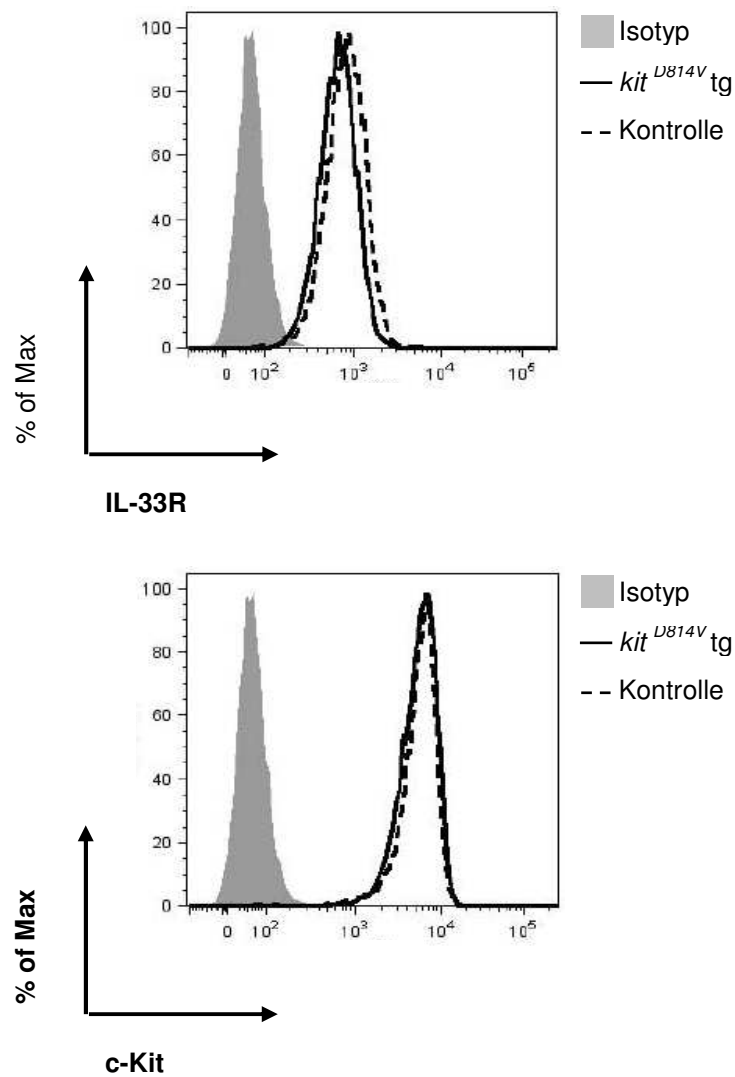
Zunächst wurde mit BMMCs aus *kit<sup>D814V/flox</sup>deleter-Cre*-doppelt-transgenen Mäusen (im Folgenden als *kit<sup>D814V</sup>*-tg-BMMCs bezeichnet) gearbeitet (Gerbaulet et al. 2010). Diese Zellen exprimieren neben dem IL-33-Rezeptor eine konstitutiv aktive *D814V*-c-Kit-Mutante auf ihrer Oberfläche (s. Abb. 12). Durch das Vorhandensein dieser Mutante kann mit Blick auf die Untersuchungen mit HMC-1-Zellen der mögliche Einfluss der c-Kit-Aktivität auf die IL-33-induzierte Signaltransduktion sowie deren Abhängigkeit von Src-Kinasen untersucht werden.

In Übereinstimmung bzw. Ergänzung zu den Ergebnissen mit HMC-1-Zellen wiesen c-Kit, ERK1/2 und JNK1 bereits eine erhöhte Basalaktivität auf, welche im Fall von ERK1/2 und JNK1 durch SU6656 inhibiert werden konnte. Die Stimulation mit IL-33 führte zu einer signifikanten Aktivierung von c-Kit, ERK1/2, p38, NF-κB, JNK1/2 und PKB/Akt im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die Inkubation mit SU6656 vor IL-33-Stimulation bewirkte eine signifikante Verminderung der Aktivierung von c-Kit, ERK1/2 und JNK1/2 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, während die Aktivierung von NF-κB und p38 SU6656-insensitiv geblieben ist (s. Abb. 13). Auffällig ist, dass im Gegensatz zu den Ergebnissen mit HMC-1-Zellen die Aktivierung von PKB/Akt nicht durch SU6656 blockiert werden konnte und bereits die alleinige Inkubation mit SU6656 zu einer Zunahme der Aktivierung sowohl von p38 als auch von NF-κB im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle führte.

Um als Positivkontrolle zu zeigen, dass *kit<sup>D814V</sup>*-tg-BMMCs einen stimulierbaren Rezeptor c-Kit besitzen, wurden die Zellen mit SCF stimuliert. Hier zeigte sich, dass SCF eine im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikante Aktivierung von c-Kit, ERK1/2, PKB/Akt sowie p38, jedoch nicht von JNK1/2 bewirkt, welche jeweils durch SU6656 inhibierbar war (s. Abb. 13). Die Stimulation mit SCF nach Inkubation mit SU6656 führte in Übereinstimmung zur alleinigen Inkubation mit SU6656 zu einer Zunahme der Aktivierung von NF-κB im Vergleich sowohl zur alleinigen Stimulation mit SCF als auch zur unstimulierten Kontrolle.

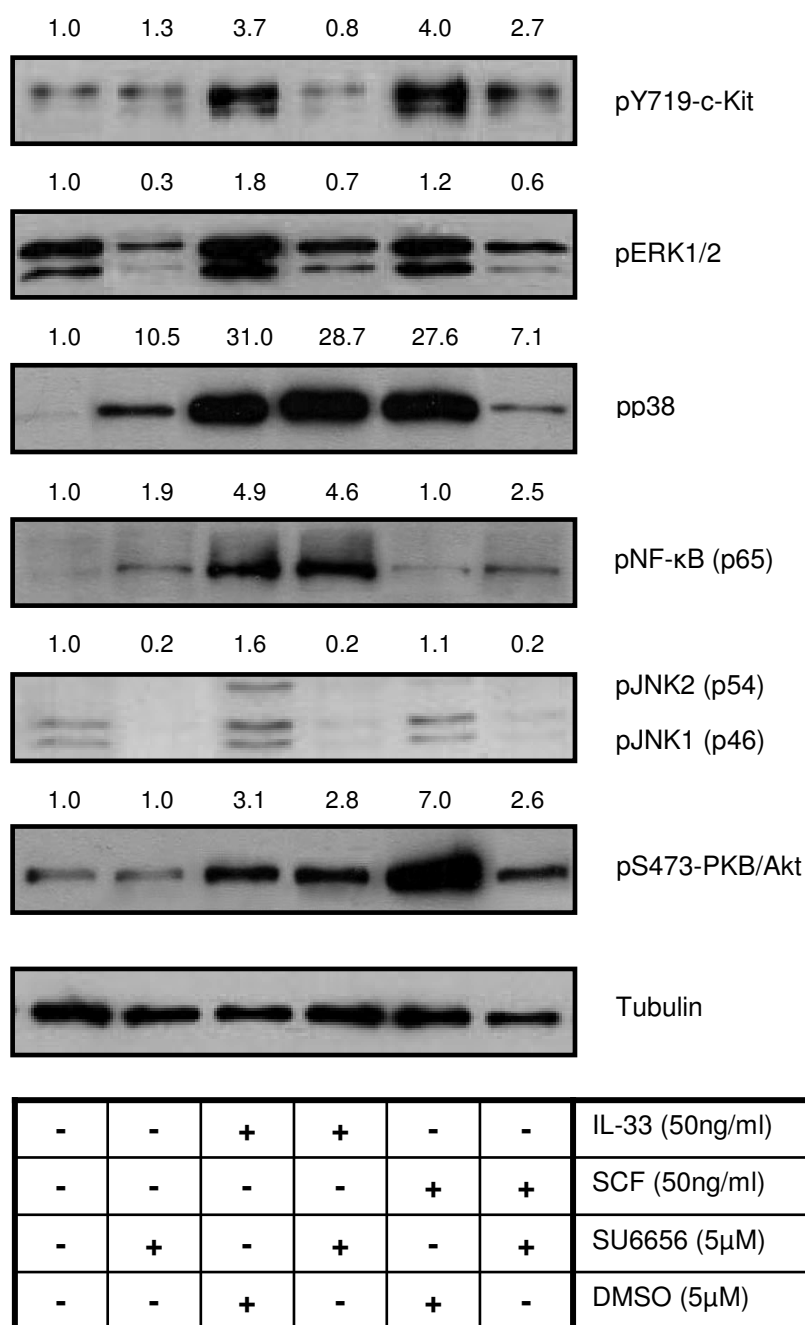
Diese Ergebnisse legen unter Einbeziehung der Untersuchungsergebnisse mit HMC-1-Zellen aus Abschnitt 5.1 nahe, dass die Aktivierung von c-Kit, zumindest als konstitutiv aktive Mutante, eine Bedingung für die Involvierung von Src-Kinasen in das Signaling des IL-33-Rezeptors ist.





**Abb. 12:  $kit^{D814V}tg$ -BMMCs exprimieren den IL-33-Rezeptor und c-Kit.**

Die Oberflächenexpression von c-Kit und des IL-33R auf  $kit^{D814V}tg$ -BMMCs (schwarze Linie) und  $kit^{D814Vflox}control$ -BMMCs (gestrichelte Linie) wurde mittels FACS gemessen.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden für 24h in SFM ausgesät und anschließend mittels gekoppeltem anti-IL-33R-AK bzw. anti-c-Kit-AK gefärbt. Die entsprechende Isotypen-Kontrolle ist als graue Fläche dargestellt.



**Abb. 13: Konstitutiv aktives c-Kit ist eine Bedingung für die Beteiligung von Src-Kinasen an der IL-33R-Signaltransduktion.**

Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in SFM ausgesät und nach 24h mit SU6656 bzw. DMSO in den angegebenen Konzentrationen für 30min präinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit IL-33 für 20min bzw. mit SCF für 10min. Nach Lyse der Zellen wurden die zellulären Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und der Phosphorylierungssatus der angegebenen Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert. Als Auftragskontrolle ist Tubulin abgebildet. Die Abbildung zeigt repräsentativ das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

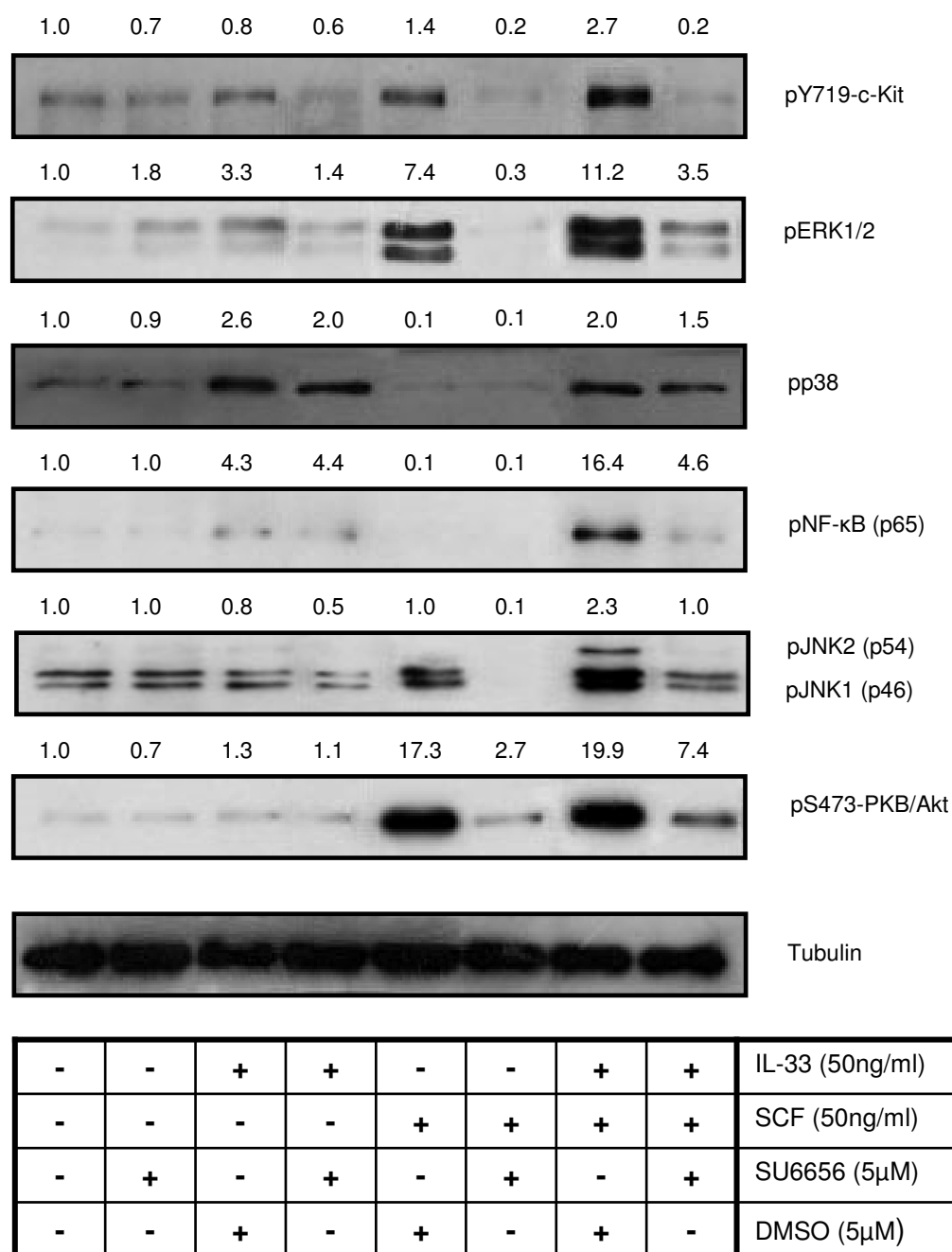
### 5.2.3 Charakterisierung des Einflusses von Src-Kinasen auf IL-33- und SCF-induzierte Signalwege in Wildtyp-BMMCs

Ausdifferenzierte WT-BMMCs exprimieren wie HMC-1-Zellen und *kit<sup>D814V</sup>*tg-BMMCs c-Kit und den IL-33-Rezeptor, besitzen jedoch im Gegensatz dazu keine konstitutiv aktive Mutante von c-Kit. Die als Voraussetzung für die Involvierung von Src-Kinasen in das IL-33R-Signaling erachtete Aktivierung von c-Kit erfolgte daher in den nachfolgenden Experimenten durch Stimulierung mit dessen physiologischem Liganden SCF.

Zunächst wurde untersucht, welche Signalwege in WT-BMMCs durch alleinige Stimulation mit IL-33 induzierbar, durch Präinkubation mit SU6656 inhibierbar (im Vergleich zur DMSO-Kontrolle) und damit von Src-Kinasen abhängig sind. Hier zeigte sich eine im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikante Phosphorylierung lediglich von ERK1/2, p38 und NF-κB, die Aktivierung von c-Kit entsprach der erhöhten Basalaktivität in der unstimulierten Kontrolle. Die IL-33-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 war SU6656-sensitiv. Die IL-33-vermittelte Aktivierung von p38 und NF-κB erwies sich hingegen als SU6656-insensitiv, demzufolge wird sie nicht durch Src-Kinasen vermittelt (s. Abb. 14).

Im Falle einer Kostimulation mit SCF und IL-33 konnte eine signifikante und im Vergleich zur jeweiligen Einzelstimulation deutlich stärkere und potenzierte Aktivierung von Y719-c-Kit, ERK1/2, JNK1/2, PKB/Akt und NF-κB gemessen werden, welche jeweils durch SU6656 inhibiert werden konnte (s. Abb. 14).

Des Weiteren wurden WT-BMMCs nur mit SCF stimuliert. Dies führte zu einer Aktivierung von Y719-c-Kit, ERK1/2, JNK1/2 und PKB/Akt, welche jedoch im Vergleich zur Kostimulation signifikant geringer und jeweils durch die Präinkubation mit SU6656 inhibierbar war. Eine mögliche SCF-vermittelte Aktivierung von p38 und NF-κB konnte nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 14).



**Abb. 14: Die IL-33R-Signaltransduktion in WT-BMMCs wird durch SCF potenziert und durch Src-Kinasen vermittelt.**

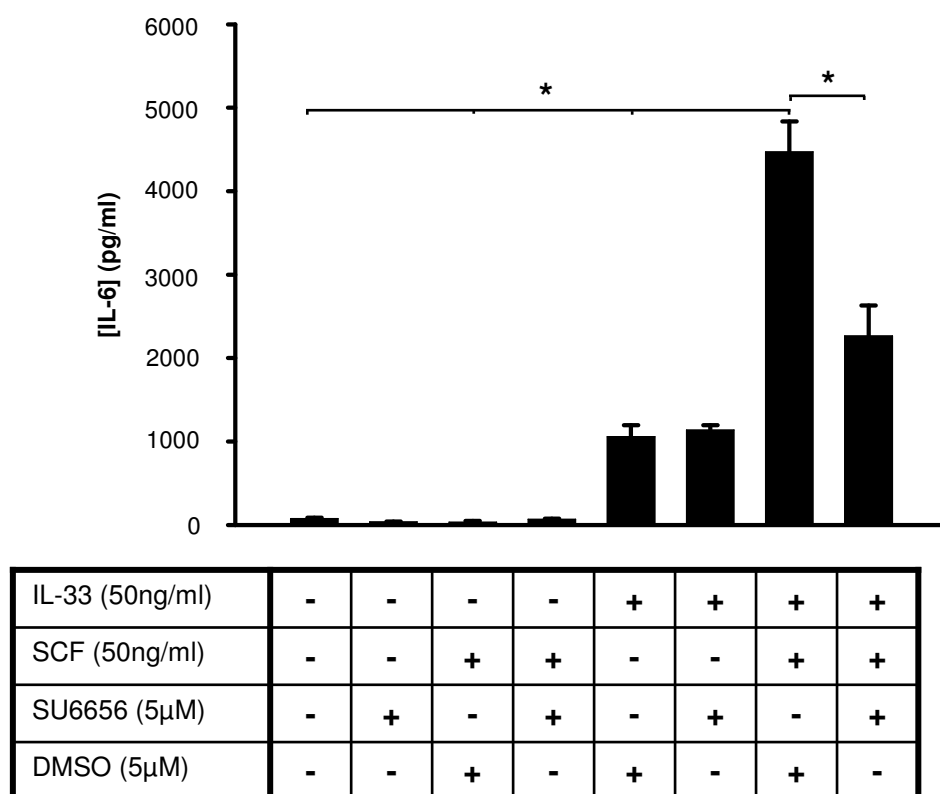
Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in SFM ausgesät und nach 24h mit SU6656 bzw. DMSO in den angegebenen Konzentrationen für 30min präinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit SCF für 30min bzw. mit IL-33 für 20min. Nach Lyse der Zellen wurden die zellulären Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und der Phosphorylierungsstatus der angegebenen Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert. Als Auftragskontrolle ist Tubulin abgebildet. Die Abbildung zeigt repräsentativ das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

#### **5.2.4 Charakterisierung des Einflusses von Src-Kinasen auf die IL-33- und SCF-induzierte Zytokinsekretion in Wildtyp-BMMCs**

Voruntersuchungen mit HMC-1-Zellen (s. Kap. 5.1) legten bereits die Bedeutung von Src-Kinasen für die IL-33R-vermittelte Zytokinsekretion von Mastzellen nahe und deuteten somit auf ihre mögliche Relevanz für die Induktion von IL-33R-Effektorfunktionen hin. Diese Hypothese wurde anhand der Messung der IL-6-Sekretion aus WT-BMMCs mittels ELISA überprüft, wobei in Übereinstimmung mit den Untersuchungen aus Abschnitt 5.2.3 die Aktivierung von c-Kit mittels SCF berücksichtigt und der Src-Kinasen-Inhibitor SU6656 eingesetzt wurde.

Während nach 24-stündiger Stimulation von WT-BMMCs mit SCF (jeweils nach Präinkubation mit SU6656 bzw. DMSO) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle keine signifikante IL-6-Freisetzung gemessen werden konnte, führte die alleinige Stimulation mit IL-33 zu einer moderaten, aber dennoch signifikanten Sekretion von IL-6. Mit SU6656 vorbehandelte und anschließend mit IL-33 stimulierte Zellen zeigten im Vergleich dazu keinen statistisch signifikanten Unterschied in der IL-6-Sekretion (s. Abb. 15).

Wie Abb. 15 weiterhin zeigt, bewirkt die 24-stündige Kostimulation mit SCF und IL-33 eine starke und im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IL-33 signifikant erhöhte Freisetzung von IL-6. Wurden die Zellen vor der Kostimulation mit SU6656 behandelt, resultierte daraus eine signifikante Verminderung der IL-6-Sekretion im Vergleich zu kostimulierten und unbehandelten Zellen (DMSO-Kontrolle).



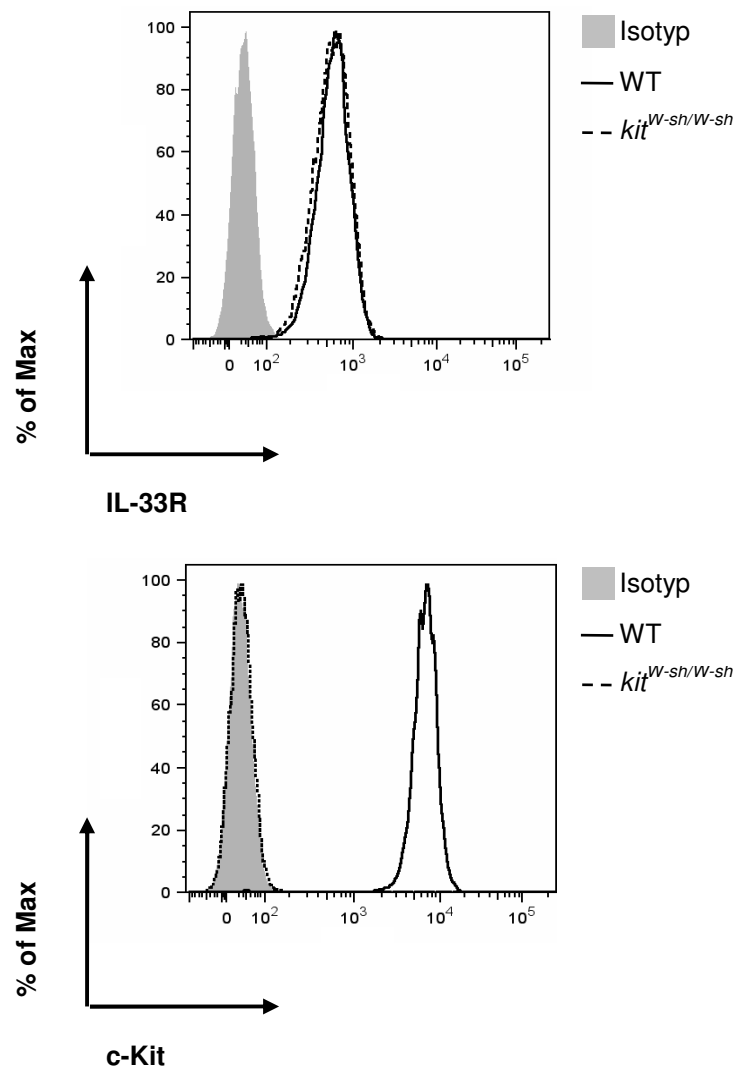
**Abb. 15: Die IL-33-induzierte Zytokinsekretion wird durch SCF potenziert und durch Src-Kinasen vermittelt.**

Jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in SFM ausgesät und nach 24 Stunden mit SU6656 bzw. DMSO in den angegebenen Konzentrationen für 30min präinkubiert und anschließend für 24h mit IL-33 bzw. SCF stimuliert. Die Kostimulation erfolgte, indem die Zellen zunächst für 30min mit SCF prästimuliert und anschließend für 24h mit IL-33 stimuliert wurden. In den Überständen wurde IL-6 mittels ELISA gemessen. Bei den Experimenten handelt es sich jeweils um eine 3-fach-Bestimmung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler.

\* $p < 0.05$

### 5.2.5 *kit*<sup>W-sh/W-sh</sup>-BMMCs: Validierung der Ergebnisse

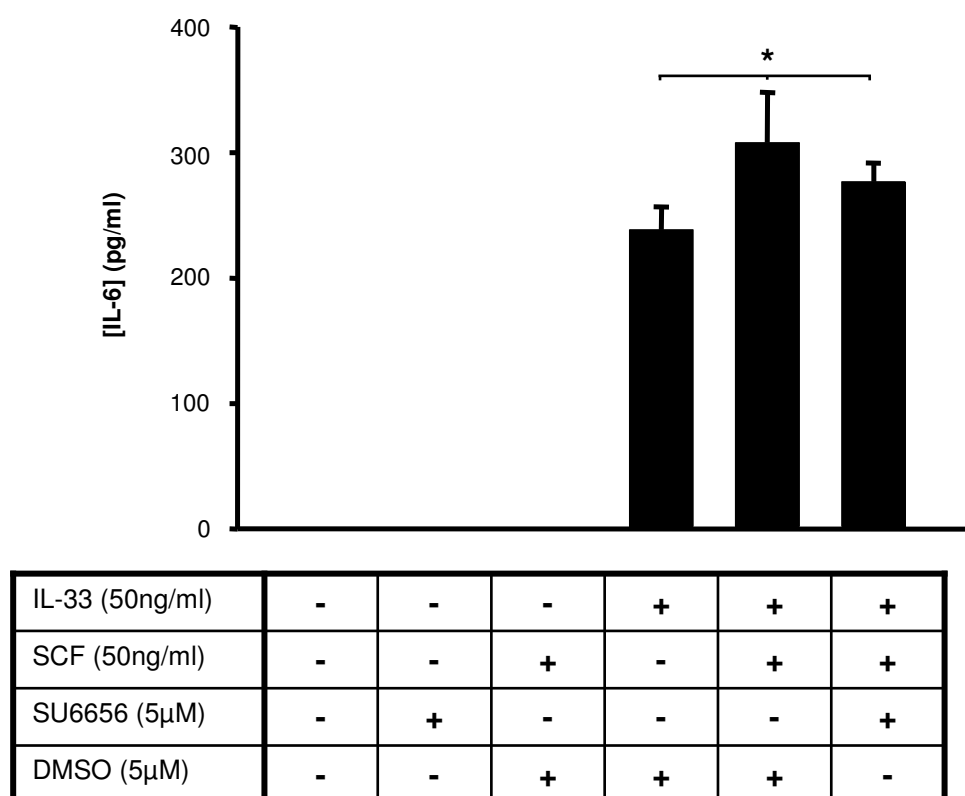
Zur Validierung der Hypothese, dass die Aktivierung von c-Kit durch SCF eine Voraussetzung für die Involvierung von Src-Kinasen in IL-33-induzierte Effektorfunktionen von Mastzellen darstellt, wurden äquivalente Experimente mit BMMCs aus *kit*<sup>W-sh/W-sh</sup>-Mäusen durchgeführt. Die *W-sh*-Mutation verhindert die Expression von c-Kit in Mastzellen (Duttlinger et al. 1993), die Expression von IL-33R ist jedoch nicht betroffen (s. Abb. 16). Abb. 17 zeigt, dass zwar die Stimulation von *kit*<sup>W-sh/W-sh</sup>-BMMCs über 24 Stunden sowohl mit IL-33 allein als auch mit IL-33 und SCF zusammen zu einer signifikanten Induktion der IL-6-Sekretion führt. Allerdings war hier im Gegensatz zu den entsprechenden Ergebnissen mit WT-BMMCs nach Kostimulation (SCF plus IL-33) keine signifikante Steigerung der Sekretion im Vergleich zur Einzelstimulation mit IL-33 nachweisbar. Dementsprechend führte auch die Präinkubation mit SU6656 nicht zu einer signifikanten Reduzierung der IL-6-Sekretion.



**Abb. 16: Vergleich der Expression von IL-33R und c-Kit zwischen WT-BMMCs und *kit*<sup>W-sh/W-sh</sup>-BMMCs.**

Die Oberflächenexpression von c-Kit und des IL-33R auf WT-BMMCs (schwarze Linie) und *kit*<sup>W-sh/W-sh</sup>-BMMCs (gestrichelte Linie) wurde mittels FACS gemessen.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden für 24h in SFM ausgesät und anschließend mittels gekoppeltem anti-IL-33R-AK bzw. anti-c-Kit-AK gefärbt. Die entsprechende Isotypen-Kontrolle ist als graue Fläche dargestellt.





**Abb. 17: Die Kostimulation von *kit*<sup>W-sh/W-sh</sup>-BMMCs bewirkt keine signifikante Steigerung der IL-6-Sekretion.**

Jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in SFM ausgesät und nach 24 Stunden mit SU6656 bzw. DMSO in den angegebenen Konzentrationen für 30min präinkubiert und anschließend für 24h mit IL-33 bzw. SCF stimuliert. Die Kostimulation erfolgte, indem die Zellen zunächst für 30min mit SCF prästimuliert und anschließend für 24h mit IL-33 stimuliert wurden. In den Überständen wurde IL-6 mittels ELISA gemessen. Bei den Experimenten handelt es sich jeweils um eine 3-fach-Bestimmung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. \*p>0.05

## 6 DISKUSSION

Das Zytokin IL-33 beeinflusst über seinen Rezeptor IL-33R Effektorfunktionen u.a. von basophilen und eosinophilen Granulozyten, T<sub>H</sub>2-Lymphozyten und Mastzellen. Die IL-33/IL-33R-Interaktion führt dabei auf intrazellulärer Ebene zur Aktivierung diverser Signalmoleküle, beispielsweise von MAP-Kinasen (ERK1/2, JNK1/2 und p38), der Proteinkinase B und des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Diese Signalwege vermitteln schließlich Effektorfunktionen wie die Produktion von Zytokinen oder Vorgänge wie Zellwachstum und –differenzierung.

Die komplexen Prozesse im Rahmen der IL-33R-Signaltransduktion sind bis dato nur unzureichend erforscht. Aktuelle Untersuchungen der Arbeitsgruppe Kamradt auf diesem Gebiet zeigten jedoch, dass IL-33 in Mastzellen über seinen Rezeptor eine Kreuzaktivierung der RTK c-Kit und daraus folgend eine Komplexbildung aus IL-33R und c-Kit bewirkt. Als entscheidende Voraussetzung hierfür ist die Tyrosinkinase-Aktivität von c-Kit identifiziert worden. Des Weiteren stellte sich die Assoziation dieser beiden Rezeptoren miteinander als Bedingung für die Induktion von IL-33-Effektorfunktionen wie der Aktivierung oben erwähnter Signalproteine sowie der Sekretion proinflammatorischer Zytokine heraus (Drube et al. 2010).

Bereits durch mehrere Studien konnte die Beteiligung von IL-33-/IL-33R-Interaktionen an einer Reihe bedeutender Erkrankungen, wie z.B. Asthma bronchiale, Atherosklerose und rheumatoider Arthritis, nachgewiesen werden, was auf eine große klinische Relevanz dieses Zytokins und seines Rezeptors hindeutet (Liew et al., 2010).

Src-Kinasen spielen eine wichtige Rolle in vielen rezeptorvermittelten Signalwegen, so z.B. im Rahmen der Signaltransduktion von RTK, Zytokin- und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Thomas und Brugge 1997). Eine Beteiligung von Src-Kinasen an der Signalweiterleitung von c-Kit (Timokhina et al. 1998, Hong et al. 2004, Shivakrupa und Linnekin 2005) sowie des hochaffinen Immunglobulin-E-Rezeptors Fc $\epsilon$ RI (Parravicini et al. 2002) in Mastzellen ist in der Literatur bereits ebenso beschrieben wie eine Beteiligung an der Transaktivierung des EGFR durch den Interferon-(IFN)- $\gamma$ -Rezeptor (Burova et al. 2007).

## 6.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

In dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass Src-Kinasen im Rahmen der IL-33R-Signaltransduktion in Mastzellen die Aktivierung wichtiger Signalwege, die von Drube et al. 2010 beschriebene IL-33-induzierte Kreuzaktivierung von c-Kit sowie biologische Effektorfunktionen von Mastzellen wie die Sekretion von IL-6 vermitteln. Als Voraussetzung für die Beteiligung von Src-Kinasen an den erwähnten Prozessen konnte die Aktivierung von c-Kit durch seinen Liganden SCF identifiziert werden (s. Abb. 18, S. 65).

HMC-1-Zellen zeichnen sich durch eine *gain-of-function*-Mutation von c-Kit aus, welche eine dauerhafte, SCF-unabhängige Aktivierung dieser Rezeptortyrosinkinase bewirkt (Kanakura et al. 1994). Die Untersuchungen mit der HMC-1-Zelllinie zeigten in Konsistenz mit bereits veröffentlichten Arbeiten, dass die Stimulation dieser Zellen mit IL-33 zu einer Aktivierung der Signalwege ERK1/2, JNK1/2, p38, NF-κB und PKB/Akt sowie zu einer Zunahme der Phosphorylierung von Y721-c-Kit (im Folgenden als *Kreuzaktivierung von c-Kit* bezeichnet) führt (Drube et al. 2010). Die IL-33-induzierte Aktivierung von ERK1/2, JNK1/2 und PKB/Akt sowie die Kreuzaktivierung von c-Kit werden hierbei durch Src-Kinasen vermittelt (s. Abb. 6). Diese Erkenntnisse konnten durch die Ergebnisse mit *kit<sup>D814V</sup>tg*-BMMCs, welche die ebenfalls konstitutiv aktive c-Kit-Mutante *D814V* exprimieren (Gerbaulet et al. 2010), bestätigt werden (s. Abb. 13). Die Ergebnisse mit HMC-1-Zellen und *kit<sup>D814V</sup>tg*-BMMCs deuteten bereits darauf hin, dass eine erhöhte Aktivität von c-Kit für die IL-33R-induzierte und von Src-Kinasen vermittelte Aktivierung von intrazellulären Signalwegen wie ERK1/2, JNK1/2 und PKB/Akt als Ursache in Erwägung zu ziehen ist.

In WT-BMMC führt hingegen erst die Induzierung der Aktivität von c-Kit durch seinen physiologischen Liganden SCF zu einer Src-Kinasen-abhängigen und im Vergleich zur Einzelstimulation mit IL-33 deutlich gesteigerten und vollständigen Aktivierung der IL-33R-induzierten Signalwege ERK1/2, JNK1/2, PKB/Akt und NF-κB (s. Abb. 14). Die durch Einzelstimulation mit IL-33 induzierte, im Vergleich zur Kostimulation (IL-33 plus SCF) moderate Aktivierung von ERK1/2 wird jedoch auch durch Src-Kinasen vermittelt. Src-Kinasen sind ebenso an der IL-33R-induzierten Kreuzaktivierung von c-Kit beteiligt. Auffällig ist, dass die IL-33R-vermittelte Aktivierung von NF-κB in Zellen mit einer konstitutiv aktiven c-Kit-Mutante (HMC-1-Zelllinie, *kit<sup>D814V</sup>tg*-BMMCs) Src-Kinasen-unabhängig, in Wildtyp-BMMCs jedoch Src-

Kinasen-anhängig erfolgt. Eine exakte Ursache hierfür konnte noch nicht eruiert werden. Diesbezüglich kann diskutiert werden, dass aufgrund der konstitutiven und damit unphysiologischen Aktivierung von c-Kit in HMC-1-Zellen und in *kit<sup>D814V</sup>tg*-BMMCs mit hoher Wahrscheinlichkeit weitere intrazelluläre Signalprozesse dysreguliert sind und dementsprechend die beobachtete Aktivierung von NF-κB über andere Signalwege, unabhängig von Src-Kinasen, zu Stande kommt.

Konsistent mit diesen Ergebnissen wird die als beispielhaft für IL-33R-induzierte Effektorfunktionen untersuchte IL-6-Sekretion ebenfalls von Src-Kinasen vermittelt, falls eine Aktivierung von c-Kit durch seinen Liganden SCF vorliegt. Die moderate Freisetzung von IL-6 nach alleiniger Stimulation mit IL-33 erfolgt ohne Beteiligung von Src-Kinasen. Erst die durch Kostimulation mit IL-33 und SCF im Vergleich zur Einzelstimulation deutlich gesteigerte IL-6-Sekretion wird von Src-Kinasen vermittelt (s. Abb. 15). Durch ein äquivalentes Experiment mit *kit<sup>W-sh/W-sh</sup>*-BMMCs, welche im Gegensatz zu WT-BMMCs kein c-Kit exprimieren (Duttlinger et al. 1993), konnten diese Ergebnisse validiert werden: Die fehlende c-Kit-Aktivität verhindert die durch Src-Kinasen vermittelte Steigerung der IL-6-Sekretion trotz Kostimulation mit SCF und IL-33 (s. Abb. 17). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass an der Vermittlung der IL-33-induzierten Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-8 in HMC-1-Zellen neben Src-Kinasen-abhängigen Signalwegen (ERK1/2, JNK1/2) ebenso Src-Kinasen-unabhängige Signalwege (p38) beteiligt sind (s. Kap. 5.1.5., Abb. 8). Diese Schlussfolgerung wird auch durch die Tatsache bestätigt, dass ebenso die alleinige Stimulation von WT-BMMCs mit IL-33 ohne die Zwischenschaltung von Src-Kinasen zu einer moderaten, wenn auch nicht vollständigen, Aktivierung der IL-6-Sekretion führt (s. Abb. 15)

Nach Vergleich der Aktivierungsprofile der untersuchten Zellen kann festgestellt werden, dass in Konsistenz zur Studie von Drube et al. erst das gemeinsame Signaling vom IL-33R und c-Kit in Synergie zu einer effektiven und vollständigen Aktivierung der Signalproteine ERK1/2, JNK1/2, NF-κB und PKB/Akt führt, wobei im Gegensatz dazu die Aktivierung der MAP-Kinase p38 nur durch IL-33 allein induziert wird. Als entscheidend erwies sich in diesem Zusammenhang die Aktivität von c-Kit, sei sie im Falle von HMC-1-Zellen und *kit<sup>D814V</sup>tg*-BMMCs konstitutiv bedingt oder im Falle von Wildtyp-BMMCs durch den physiologischen Liganden SCF ausgelöst. Auf diese Art und Weise werden die Signale von zwei verschiedenen Rezeptoren (dem Zytokin-Rezeptor IL-33R und der RTK c-Kit) in ein gemeinsames Netzwerk integriert

und somit die Bandbreite der IL-33-getriggerten Signalprozesse und die sich daraus ergebenden biologischen Effektorfunktionen von Mastzellen gesteigert. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen außerdem die Hypothese, dass Src-Kinasen eine wesentliche Rolle in der Orchestrierung dieses vom IL-33R und c-Kit ausgehenden Signalnetzwerkes spielen (s. Abb. 18). Die von Drube et al. beschriebene IL-33R-induzierte Kreuzaktivierung von c-Kit wird ebenfalls durch Src-Kinasen vermittelt. Bemerkenswert an dieser Stelle ist, dass die durch Src-Kinasen vermittelte Kommunikation zwischen diesen beiden Rezeptoren bidirektional verläuft: So ist die Src-Kinasen-abhängige Aktivierung von c-Kit durch die IL-33-/IL-33R-Interaktion (d.h. die Phosphorylierung von c-Kit am Tyrosinrest 719 [murin] bzw. 721 [human]) erst nach vorangehender Aktivierung von c-Kit durch dessen Liganden SCF möglich. Dieser Prozess wird daher *Kreuzaktivierung* genannt. Die IL-33-/SCF-induzierte Aktivierung bekannter c-Kit-vermittelter Signalwege wie ERK1/2, JNK1/2 und PKB/Akt (Rönnstrand et al. 2004) ist von Src-Kinasen abhängig. Src-Kinasen haben andererseits keinen Einfluss auf die Induzierung des IL-33R-Signalproteins p38. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B stellt insofern einen Sonderfall dar, da dessen moderate Aktivierung zwar durch IL-33 alleine ohne Beteiligung von Src-Kinasen induziert werden kann, aber erst die vollständige Aktivierung nach Kostimulation (IL-33 plus SCF) durch Src-Kinasen vermittelt wird. Auffällig ist außerdem, dass auch die IL-33-vermittelte (moderate) Aktivierung von ERK1/2 unabhängig von SCF unter Beteiligung von Src-Kinasen abläuft (s. Abb. 14). Ebenso wie das nahe verwandte Zytokin IL-18, welches in Fibroblasten über Src, dem Prototyp der Familie der Src-Kinasen, ERK1/2 aktivieren kann (Morel et al. 2002), ist offensichtlich auch IL-33 in der Lage, über Src-Kinasen bestimmte Signalwege wie ERK1/2 unabhängig von c-Kit einzuleiten.

## 6.2 Mögliche Positionen der Src-Kinasen innerhalb des IL-33R-/c-Kit-Signalnetzwerkes

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind konsistent mit einer Reihe von Veröffentlichungen über die Rolle von Src-Kinasen in Mastzellen. Die aktuelle Datenlage bezüglich ihrer Beteiligung an der Signaltransduktion des SCF-Rezeptors c-Kit und der Transaktivierung von RTK durch Zytokinrezeptoren legte bereits einen möglichen Einfluss auf die Kreuzaktivierung von c-Kit durch den IL-33R nahe (Thomas und Brugge 1997, Timokhina et al. 1998, Hong et al. 2004, Shivakrupa und Linnekin 2005, Cheng et al. 2010). Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnten die Beteiligung von Src-Kinasen sowohl an der erwähnten Kreuzaktivierung als auch an der Aktivierung eines von c-Kit und IL-33R ausgehenden Signalnetzwerkes aufzeigen (s. Kap. 6.1). Über den genauen Mechanismus der Signalübertragung zwischen diesen beiden Rezeptoren sowie die exakte Position der Src-Kinasen innerhalb dieser Signalkaskade kann jedoch noch keine exakte Aussage gemacht werden (s. Abb. 18):

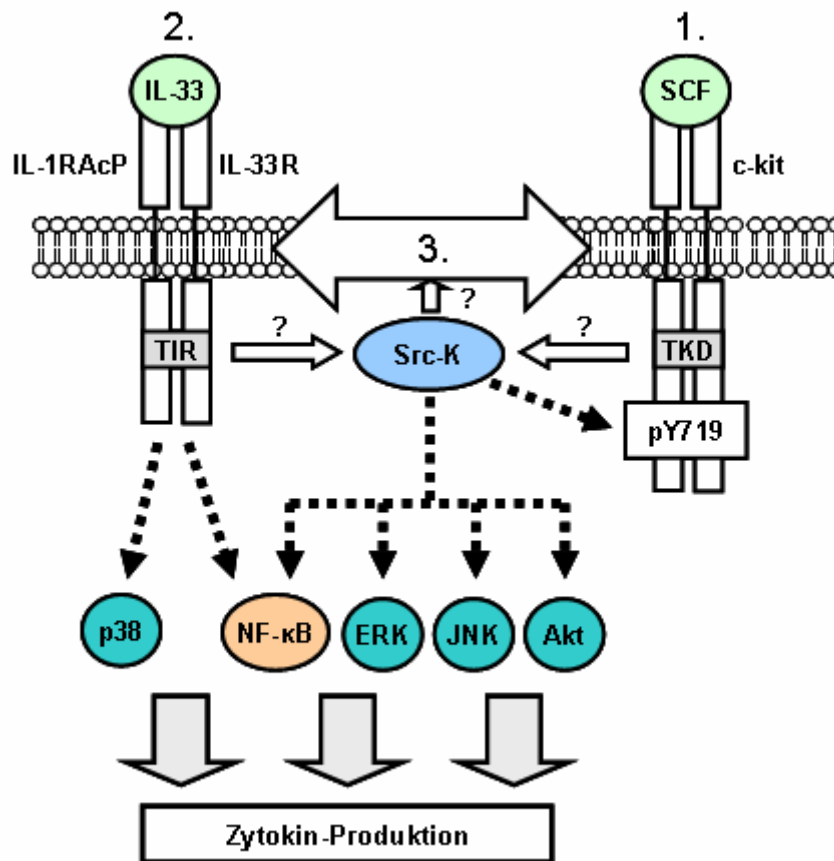
Wie bereits erwähnt, ist die Aktivität von c-Kit Grundvoraussetzung für die Beteiligung von Src-Kinasen an den untersuchten Signalprozessen. Es konnte gezeigt werden, dass in HMC-1-Zellen bereits die Induzierung der Basalaktivität bzw. in *kit<sup>D814V</sup>tg*- und WT-BMMCs die SCF-vermittelte Kreuzaktivierung, d.h. die Phosphorylierung von c-Kit am Tyrosinrest 721 (human) bzw. 719 (murin), über Src-Kinasen erfolgt (s. Abb. 6, Abb. 13, Abb. 14), da der verwendete Inhibitor SU6656 spezifisch Src-Kinasen, nicht jedoch die Kinaseaktivität von c-Kit hemmt (Tatton et al. 2003). Dementsprechend wird in diesem Zusammenhang auch die Aktivierung der SCF-/c-Kit-Signalwege ERK1/2, JNK1/2 und PKB/Akt von Src-Kinasen vermittelt. Anzunehmen ist in diesem Zusammenhang daher auch eine direkte Automodulation von c-Kit durch Src-Kinasen im Sinne einer Phosphorylierung von Tyrosinresten in Ergänzung zu ihrer schon bekannten Aktivität *downstream* von c-Kit (s.u.). In der Literatur ist bereits die Modulierung diverser RTK wie dem EGFR, dem PDGFR, dem IGFR sowie von c-Kit durch Src-Kinasen beschrieben, welche z.B. im Falle des EGFR zu einer positiven Regulation der Signaltransduktion und im Falle von c-Kit nach SCF-Stimulation zu einer direkten und selektiven Phosphorylierung von Tyrosinresten durch Src führt. (Thomas und Brugge 1997, Moro et al. 2002, Lennartsson et al. 2003).

Die Bindung von SCF an seinen Rezeptor c-Kit führt laut Literatur konsekutiv u.a. auch zu einer Autophosphorylierung der c-Kit-Tyrosinreste Y703 und Y936. An diese Phosphotyrosinreste können dann wiederum die Src-Kinasen Fyn und Lyn andocken, um auf diese Art und Weise aktiviert zu werden (Rönnstrand 2004, Roskoski 2005). Weitere Studien über die zentrale Rolle der SCF-vermittelten Aktivierung von c-Kit und der daraus resultierenden Phosphorylierung der Tyrosinreste Y719 (murin) bzw. Y721 (human) zeigen, dass diese beiden Phosphotyrosinreste neben Y567 als Ausgangspunkt für eine Signalkaskade *downstream* des Rezeptors c-Kit, bestehend aus der Src-Kinase Fyn sowie des Phosphoinositid-3-Kinase-(PI3K-)Weges, angesehen werden können. Dabei übt Fyn einen positiv regulatorischen Einfluss auf die PI3K aus. Über die PI3K wird dann im weiteren Verlauf die Aktivierung der Signalmoleküle p38, Akt/PKB, ERK1/2, JNK1/2 und NF- $\kappa$ B reguliert (Lennartsson et al. 1999, Kitaura et al. 2000, Ueda et al. 2002, Rönnstrand 2004, Samayawardhena et al. 2007). Unter diesen Gesichtspunkten kommt wahrscheinlich der in dieser Arbeit beschriebenen IL-33R-induzierten und Src-Kinasen-vermittelten Kreuzaktivierung von c-Kit (d.h. die oben beschriebene Phosphorylierung der c-Kit-Tyrosinreste Y719 [murin] bzw. Y721 [human]) über die konsekutive Aktivierung des PI3K-Weges die entscheidende Bedeutung in der Initiierung des gemeinsamen IL-33R-/c-Kit-Signalnetzwerkes zu. Die genannten Studien legen auch eine mögliche zentrale Bedeutung von Fyn innerhalb des untersuchten IL-33R-/c-Kit-Signalnetzwerkes nahe. Im Widerspruch zur zitierten Literatur zeigen jedoch die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Aktivierung von p38 im Rahmen der IL-33R-/c-Kit-Signaltransduktion unabhängig von Src-Kinasen erfolgt. Als mögliches Bindeglied zwischen der Signaltransduktion von IL-33R und c-Kit kann auch das Adapterprotein TRAF6 diskutiert werden, welches eine wichtige Rolle in der Initiierung des IL-33R-Signalings spielt (s. Kap. 2.2.1). In diesem Zusammenhang konnten Yamada et al. zeigen, dass es im Verlauf der Signaltransduktion des TIR-Rezeptorfamilienmitgliedes IL-1R zu einer Assoziation der Tyrosinkinase Syk an TRAF6 kommt (Yamada et al. 2001). Syk wiederum kann durch eine Interaktion mit der Tyrosinkinase Fyn aktiviert werden (Deckert et al. 1998). Eine Rolle von Syk in der IL-33R-Signaltransduktion ist hingegen bis dato nicht beschrieben. Die hypothetische Möglichkeit einer direkten Aktivierung von Src-Proteinkinasen im Verlauf der physiologischen IL-33R-Signaltransduktion ist bereits erörtert worden

(Morel et al. 2002, s. Kap. 6.1). Hierzu liegen jedoch noch keine entsprechenden Studien vor.

Eine aktuelle Studie von Mun et al. berichtet über die Kooperation des IL-33R mit der RTK *macrophage colony-stimulating factor receptor* (M-CSFR) in CD14<sup>+</sup>-Monozyten (Mun et al. 2010). IL-33 führt hier in der Anwesenheit von M-CSF u.a. zu einer Aktivierung von Src sowie zu einer Potenzierung der Aktivierung von Akt und ERK1/2. Es konnte gezeigt werden, dass beide Zytokine zwar über unterschiedliche Rezeptoren operieren, dafür aber ebenso wie IL-33 und SCF über die Aktivierung von Src-Kinasen gemeinsame Signalwege benutzen und so in Synergie ihre biologischen Effektorfunktionen entfalten. Diese Veröffentlichung liefert somit ein weiteres Beispiel für eine von Src-Kinasen vermittelte Interaktion zwischen dem Zytokinrezeptor IL-33R und einer RTK wie dem M-CSFR. Nach einer Studie von Cheng et al. vermittelt Src die IL-1 $\beta$ -induzierte Transaktivierung des PDGFR und des EGFR in Alveolarzellen (Cheng et al. 2010). Die Beeinflussung von Interaktionen zwischen Rezeptoren der TIR-Familie wie IL-33R und IL-1R (s. Kap. 2.2.1) und Rezeptortyrosinkinasen wie c-Kit, M-CSFR, PDGFR und EFGR durch Src-Kinasen scheint ein verbreitetes biologisches Motiv zu sein. Auf diese Art und Weise wird zum einen im Sinne eines Regulierungsmechanismus die unzweckmäßige Aktivierung *eines* Rezeptors und der nachfolgenden Signalkaskade verhindert. Zum anderen werden durch die beschriebenen Interaktionen eine Verbreiterung des Signalspektrums von zwei verschiedenen Rezeptoren und somit möglicherweise die Induzierung zelltyp-spezifischer Effektorfunktionen erreicht.





**Abb. 18: Überblick über die Position der Src-Kinasen im IL-33R-/c-Kit-Signalnetzwerk.**

Nach Präaktivierung von c-Kit durch SCF (1.) und anschließender Bindung von IL-33 an seinen Rezeptor (2.) kommt es zur Formation eines Rezeptorkomplexes (3.) (Drube et al. 2010) sowie unter Beteiligung von Src-Kinasen zur Initiierung eines gemeinsamen Signalnetzwerkes. Die vollständige IL-33-induzierte Aktivierung von NF-κB, ERK, JNK und Akt erfolgt unter Vermittlung von Src-Kinasen, p38 wird dagegen Src-Kinasen-unabhängig aktiviert. Die Kreuzaktivierung von c-Kit durch Phosphorylierung des Tyrosinrest Y719/Y721 erfolgt ebenfalls durch Src-Kinasen. Über die Aktivierung der genannten Signalproteine wird die IL-33-induzierte Produktion von IL-6 als beispielhafte biologische Effektorfunktion vermittelt. Die exakte Position und Funktion von Src-Kinasen innerhalb der gemeinsamen IL-33R-/c-Kit-Signaltransduktion sind noch weitestgehend unaufgeklärt.

### 6.3 Ausblick

Zu klären bleibt in diesem Zusammenhang die Frage, ob Src-Kinasen lediglich die *funktionelle* Interaktion zwischen dem IL-33R und c-Kit im Sinne eines gemeinsamen Signalnetzwerkes regulieren, oder ob sie auch direkt an der von Drube et al. beschriebenen *physischen* Interaktion (Formation eines Rezeptorkomplexes) beteiligt sind. Erste eigene Untersuchungen bezüglich dieser Fragestellung mittels Co-Immunopräzipitation deuten bereits in diese Richtung. Aufgrund noch fehlender Signifikanz werden diese Daten jedoch nicht in dieser Arbeit publiziert.

Da der pharmakologische Inhibitor SU6656 alle Proteinkinasen aus der Src-Familie hemmt, gilt es in zukünftigen Experimenten exakt zu bestimmen, welche der neun bekannten Tyrosinkinasen aus der Src-Familie die beschriebenen Prozesse innerhalb der IL-33R-/c-Kit-Signaltransduktion initiiert. Aufgrund der bereits bekannten positiv regulatorischen Rolle von Fyn in Bezug auf die Signaltransduktion von c-Kit in Mastzellen (s.o.) sollten entsprechende Experimente mit BMMCs aus *fyn*<sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt werden. Src vermittelt die IL-1 $\beta$ -induzierte Transaktivierung von PDGFR und EGFR (Cheng et al. 2010, s.o.) sowie die Interaktion zwischen IL-33R und M-CSFR (Mun et al., s.o.), sodass auch diese Proteinkinase als möglicher Vermittler zwischen IL-33R und c-Kit in Betracht gezogen werden sollte.

Neben Mastzellen exprimieren auch andere Zellen des Immunsystems (basophile und eosinophile Granulozyten, T<sub>H</sub>2-Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen), Endothel- und Epithelzellen den IL-33R sowie ein breites Spektrum an RTK, wie z.B. c-Kit im Fall von basophilen und eosinophilen Granulozyten (Columbo et al. 1992, Yuan et al. 1997). Unter Beachtung dieser Aspekte wäre es interessant zu wissen, inwiefern auch in diesen Zellen der IL-33R in der Lage ist, mit verschiedenen Zelltyp-spezifischen RTK zu interagieren bzw. ob diese Rezeptorinteraktionen ebenso wie im Fall von c-Kit und IL-33R in Mastzellen unter Beteiligung von Src-Kinasen erfolgen.

Störungen eines solch komplexen Signalnetzwerkes wie dem in dieser Arbeit beschriebenen spielen möglicherweise eine Rolle in der Entwicklung von Krankheitsprozessen. So konnten beispielsweise in den Atemwegen von Patienten mit Asthma bronchiale erhöhte Konzentrationen von IL-33 und SCF nachgewiesen werden. Ebenso wurde über eine synergistische Wirkung von IL-33 und SCF im

Rahmen dieser allergischen Entzündung berichtet (Al-Muhsen et al. 2004, Allakhverdi et al. 2009). Es bleibt zu klären, ob Src-Kinasen auch eine Rolle in der Vermittlung eines solchen *in-vivo*-Effektes zuteil kommt. Weitere Krankheitsprozesse, in denen die Wirkung von IL-33 auf Mastzellen eine pathogenetische Rolle spielt, wie zum Beispiel das Mausmodell der Rheumatoiden Arthritis (Xu et al. 2008), werden möglicherweise durch Src-vermittelte Interaktionen des IL-33R mit c-Kit oder anderen RTK moduliert. Proteinkinasen aus der Src-Familie könnten somit in Zukunft ein interessantes pharmakologisches *target* für spezifische Inhibitoren im Rahmen von IL-33-induzierten Krankheitsprozessen darstellen.

## 7 SCHLUSSFOLGERUNGEN

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass Src-Kinasen in Mastzellen eine bedeutende Rolle in der Regulierung eines gemeinsam von dem Zytokinrezeptor IL-33R und der Rezeptortyrosinkinase c-Kit ausgehenden Signalnetzwerkes spielen. Als Voraussetzung für die Beteiligung von Src-Kinasen an der IL-33R-Signaltransduktion in Mastzellen konnte demnach die Aktivierung von c-Kit durch seinen physiologischen Liganden SCF identifiziert werden, d.h. erst nach Prästimulation von c-Kit mit SCF sind Src-Kinasen Bestandteil des IL-33-/IL-33R-Signalings. Wichtige Komponenten der gemeinsamen IL-33R-/c-Kit-Signaltransduktion werden von Src-Kinasen vermittelt bzw. durch sie aktiviert. Im Einzelnen handelt es sich hierbei um die MAP-Kinasen ERK1/2 und JNK1/2, den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B sowie den Proteinkinase-B-/Akt-Signalweg, wobei in Übereinstimmung mit der Studie von Drube et al. erst die Kostimulation mit IL-33 *und* SCF zu einer vollständigen und im Vergleich zur jeweiligen Einzelstimulation signifikant gesteigerten Aktivierung dieser Signalwege führt (Drube et al. 2010). Ebenso wird eine durch IL-33 induzierte Kreuzaktivierung von c-Kit, d.h. eine Phosphorylierung der c-Kit-Tyrosinreste 719 (murin) bzw. 721 (human), durch Src-Kinasen vermittelt, falls c-Kit durch SCF präaktiviert wurde. Die IL-33-induzierte Aktivierung der MAP-Kinase p38 kann hingegen nicht durch Kostimulation mit SCF gesteigert werden und erfolgt dementsprechend unabhängig von Src-Kinasen. Auch die beispielhaft für biologische IL-33R-Effektorfunktionen in Mastzellen untersuchte Sekretion von IL-6 wird durch Src-Kinasen vermittelt, falls neben der Aktivierung des IL-33R zusätzlich eine Stimulation von c-Kit durch SCF vorliegt.

Durch Src-Kinasen werden somit die Signale von zwei unterschiedlichen Rezeptoren in ein gemeinsames Netzwerk integriert und auf diese Art und Weise das Spektrum der IL-33-induzierten Signalprozesse und der dadurch aktivierten Effektorfunktionen vergrößert. Die Voruntersuchungen mit HMC-1-Zellen im Rahmen dieser Arbeit deuten andererseits darauf hin, dass für die IL-33-induzierte Zytokinsekretion sowohl Src-Kinasen-abhängige Signalwege wie ERK1/2 und JNK1/2, als auch Src-Kinasen-unabhängige Signalwege wie die MAP-Kinase p38 von Bedeutung sind.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit kann jedoch noch keine Aussage getätigt werden, an welcher Position im Ablauf des gemeinsamen IL-33R-/c-Kit-Signalnetzwerkes die Aktivierung der Src-Kinasen erfolgt. Anzunehmen

ist unter Beachtung früherer Studien zur c-Kit-Signaltransduktion in erster Linie eine Aktivierung *downstream* von c-Kit nach dessen Aktivierung durch SCF. Auch eine möglicherweise über diverse Adapterproteine laufende Aktivierung im Rahmen der IL-33R-Signaltransduktion ist denkbar. Die Hypothese, dass Src-Kinasen einen direkten Einfluss auf die von Drube et al. beschriebene Rezeptorkomplexformation aus IL-33R und c-Kit besitzen, konnte nicht abschließend bestätigt werden. Entsprechende Voruntersuchungen deuten jedoch bereits in diese Richtung (Daten nicht veröffentlicht).

Fehlregulationen eines solch komplexen Signalnetzwerkes und den daraus folgenden biologischen Effektorfunktionen in Mastzellen spielen möglicherweise auch eine Rolle in der Entstehung von Krankheitsprozessen wie Allergie und Asthma bronchiale. Zur Evaluierung von Src-Kinasen als mögliches therapeutisches Ziel sind daher in Zukunft u.a. entsprechende *in-vivo*-Experimente am Tiermodell notwendig.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Al-Muhsen SZ, Shablovsky G, Olivenstein R, Mazer B, Hamid Q (2004). The expression of stem cell factor and c-kit receptor in human asthmatic airways. *Clin Exp Allergy* **34**: 911-916.

Ali S, Huber M, Kollewe C, Bischoff SC, Falk W, Martin MU (2007). IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18660-18665.

Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G (2007). Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol* **179**: 2051-2054.

Allakhverdi Z, Comeau MR, Smith DE, Toy D, Endam LM, Desrosiers M *et al* (2009). CD34<sup>+</sup> hemopoietic progenitor cells are potent effectors of allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **123**: 472-478.

Arend WP, Palmer G, Gabay C (2008). IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* **223**: 20-38.

Bellone G, Silvestri S, Artusio E, Tibaudi D, Turletti A, Geuna M *et al* (1997). Growth stimulation of colorectal carcinoma cells via the c-kit receptor is inhibited by TGF-beta 1. *J Cell Physiol* **172**: 1-11.

Belsches AP, Haskell MD, Parsons SJ (1997). Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis. *Front Biosci* **2**: d501-518.

Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W *et al* (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13681-13686.

Blake RA, Broome MA, Liu X, Wu J, Gishizky M, Sun L *et al* (2000). SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. *Mol Cell Biol* **20**: 9018-9027.

Bolen JB, Rowley RB, Spana C, Tsygankov AY (1992). The Src family of tyrosine protein kinases in hemopoietic signal transduction. *FASEB J* **6**: 3403-3409.

Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O'Neill LA *et al* (2004). ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* **5**: 373-379.

Bromann PA, Korkaya H, Courtneidge SA (2004). The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene* **23**: 7957-7968.

Burova E, Vassilenko K, Dorosh V, Gonchar I, Nikolsky N (2007). Interferon gamma-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett* **581**: 1475-1480.

Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ (1988). Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk Res* **12**: 345-355.

Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein RA (2007). IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol* **179**: 2551-2555.

Chang JH, Gill S, Settleman J, Parsons SJ (1995). c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. *J Cell Biol* **130**: 355-368.

Cheng CY, Kuo CT, Lin CC, Hsieh HL, Yang CM (2010). IL-1beta induces expression of matrix metalloproteinase-9 and cell migration via a c-Src-dependent, growth factor receptor transactivation in A549 cells. *Br J Pharmacol* **160**: 1595-1610.

de Laszlo SE, Visco D, Agarwal L, Chang L, Chin J, Croft G *et al* (1998). Pyrroles and other heterocycles as inhibitors of p38 kinase. *Bioorg Med Chem Lett* **8**: 2689-2694.

Deckert M, Elly C, Altman A, Liu YC (1998). Coordinated regulation of the tyrosine phosphorylation of Cbl by Fyn and Syk tyrosine kinases. *J Biol Chem* **273**: 8867-8874.

Drube S, Heink S, Walter S, Löhn T, Grusser M, Gerbaulet A *et al* (2010). The receptor tyrosine kinase c-Kit controls IL-33 receptor signaling in mast cells. *Blood* **115**: 3899-3906.

Duttlinger R, Manova K, Chu TY, Gyssler C, Zelenetz AD, Bachvarova RF *et al* (1993). W-sash affects positive and negative elements controlling c-kit expression: ectopic c-kit expression at sites of kit-ligand expression affects melanogenesis. *Development* **118**: 705-717.

Edling CE, Hallberg B (2007). c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 1995-1998.

Funakoshi-Tago M, Tago K, Hayakawa M, Tominaga S, Ohshio T, Sonoda Y *et al* (2008). TRAF6 is a critical signal transducer in IL-33 signaling pathway. *Cell Signal* **20**: 1679-1686.

Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U *et al* (1993). Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* **92**: 1736-1744.

Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M (2005). Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* **23**: 749-786.



Galli SJ, Tsai M (2010). Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol* **40**: 1843-1851.

Gerbaulet A, Wickenhauser C, Scholten J, Peschke K, Drube S, Horny HP *et al* (2010). Mast cell hyperplasia, B cell malignancy, and intestinal inflammation in mice with conditional expression of a constitutively active kit. *Blood*.

Gilfillan AM, Rivera J (2009). The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol Rev* **228**: 149-169.

Grimbaldeston MA, Chen CC, Piliponsky AM, Tsai M, Tam SY, Galli SJ (2005). Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am J Pathol* **167**: 835-848.

Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S (2007). Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem* **282**: 26369-26380.

Hines SJ, Litz JS, Krystal GW (1999). Coexpression of c-kit and stem cell factor in breast cancer results in enhanced sensitivity to members of the EGF family of growth factors. *Breast Cancer Res Treat* **58**: 1-10.

Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S *et al* (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* **279**: 577-580.

Ho LH, Ohno T, Oboki K, Kajiwara N, Suto H, Iikura M *et al* (2007). IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcεRI signals. *J Leukoc Biol* **82**: 1481-1490.

Hong H, Kitaura J, Xiao W, Horejsi V, Ra C, Lowell CA *et al* (2007). The Src family kinase Hck regulates mast cell activation by suppressing an inhibitory Src family kinase Lyn. *Blood* **110**: 2511-2519.

Hong L, Munugalavadla V, Kapur R (2004). c-Kit-mediated overlapping and unique functional and biochemical outcomes via diverse signaling pathways. *Mol Cell Biol* **24**: 1401-1410.

Huang E, Nocka K, Beier DR, Chu TY, Buck J, Lahm HW *et al* (1990). The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* **63**: 225-233.

Ilikura M, Suto H, Kajiwara N, Oboki K, Ohno T, Okayama Y *et al* (2007). IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest* **87**: 971-978.

Kakkar R, Lee RT (2008). The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 827-840.

Kanakura Y, Furitsu T, Tsujimura T, Butterfield JH, Ashman LK, Ikeda H *et al* (1994). Activating mutations of the c-kit proto-oncogene in a human mast cell leukemia cell line. *Leukemia* **8 Suppl 1**: S18-22.

Karni R, Jove R, Levitzki A (1999). Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene* **18**: 4654-4662.

Kearley J, Buckland KF, Mathie SA, Lloyd CM (2009). Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway. *Am J Respir Crit Care Med* **179**: 772-781.

Kitaura J, Asai K, Maeda-Yamamoto M, Kawakami Y, Kikkawa U, Kawakami T (2000). Akt-dependent cytokine production in mast cells. *J Exp Med* **192**: 729-740.

Kondo Y, Yoshimoto T, Yasuda K, Futatsugi-Yumikura S, Morimoto M, Hayashi N *et al* (2008). Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol* **20**: 791-800.

Krystal GW, Hines SJ, Organ CP (1996). Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor. *Cancer Res* **56**: 370-376.

Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S *et al* (2009). IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* **183**: 6469-6477.

Lennartsson J, Blume-Jensen P, Hermanson M, Pontén E, Carlberg M, Rönstrand L (1999). Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncogene* **18**: 5546-5553.

Lennartsson J, Wernstedt C, Engström U, Hellman U, Rönstrand L (2003). Identification of Tyr900 in the kinase domain of c-Kit as a Src-dependent phosphorylation site mediating interaction with c-Crk. *Exp Cell Res* **288**: 110-118.

Liew FY, Pitman NI, McInnes IB (2010). Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* **10**: 103-110.

Liu X, Li M, Wu Y, Zhou Y, Zeng L, Huang T (2009). Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biochem Biophys Res Commun* **386**: 181-185.

Löhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC *et al* (1998). T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6930-6935.

McLaren JE, Michael DR, Salter RC, Ashlin TG, Calder CJ, Miller AM *et al* (2010). IL-33 reduces macrophage foam cell formation. *J Immunol* **185**: 1222-1229.

Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N *et al* (2008). IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med* **205**: 339-346.

Morel JC, Park CC, Zhu K, Kumar P, Ruth JH, Koch AE (2002). Signal transduction pathways involved in rheumatoid arthritis synovial fibroblast interleukin-18-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. *J Biol Chem* **277**: 34679-34691.

Moritz DR, Rodewald HR, Gheyselinck J, Klemenz R (1998). The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. *J Immunol* **161**: 4866-4874.

Moro L, Dolce L, Cabodi S, Bergatto E, Boeri Erba E, Smeriglio M *et al* (2002). Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J Biol Chem* **277**: 9405-9414.

Moulin D, Donzé O, Talabot-Ayer D, Mézin F, Palmer G, Gabay C (2007). Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine* **40**: 216-225.

Moussion C, Ortega N, Girard JP (2008). The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* **3**: e3331.

Mun SH, Ko NY, Kim HS, Kim JW, Kim dK, Kim AR *et al* (2010). Interleukin-33 stimulates formation of functional osteoclasts from human CD14(+) monocytes. *Cell Mol Life Sci* **67**: 3883-3892.

Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y *et al* (1995). Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10560-10564.

Newton R, Cambridge L, Hart LA, Stevens DA, Lindsay MA, Barnes PJ (2000). The MAP kinase inhibitors, PD098059, UO126 and SB203580, inhibit IL-1beta-dependent PGE(2) release via mechanistically distinct processes. *Br J Pharmacol* **130**: 1353-1361.

Ning ZQ, Li J, McGuinness M, Arceci RJ (2001). STAT3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit induced tumorigenicity. *Oncogene* **20**: 4528-4536.

Odom S, Gomez G, Kovarova M, Furumoto Y, Ryan JJ, Wright HV *et al* (2004). Negative regulation of immunoglobulin E-dependent allergic responses by Lyn kinase. *J Exp Med* **199**: 1491-1502.

Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA, Viatte S *et al* (2009). Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum* **60**: 738-749.

Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y *et al* (2002). Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol* **3**: 741-748.

Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA (2009). Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* **113**: 1526-1534.

Préfontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, Audusseau S, Olivenstein R, Halayko AJ *et al* (2009). Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol* **183**: 5094-5103.

Prussin C, Metcalfe DD (2006). 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* **117**: S450-456.

Pushparaj PN, Tay HK, H'ng SC, Pitman N, Xu D, McKenzie A *et al* (2009). The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 9773-9778.

Ralston R, Bishop JM (1985). The product of the protooncogene c-src is modified during the cellular response to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 7845-7849.

Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H (2009). IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol* **123**: 1047-1054.

Rivera J, Olivera A (2007). Src family kinases and lipid mediators in control of allergic inflammation. *Immunol Rev* **217**: 255-268.

Roskoski R (2005). Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **337**: 1-13.

Rönnstrand L (2004). Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci* **61**: 2535-2548.

Samayawardhena LA, Kapur R, Craig AW (2007). Involvement of Fyn kinase in Kit and integrin-mediated Rac activation, cytoskeletal reorganization, and chemotaxis of mast cells. *Blood* **109**: 3679-3686.

Samayawardhena LA, Pallen CJ (2008). Protein-tyrosine phosphatase alpha regulates stem cell factor-dependent c-Kit activation and migration of mast cells. *J Biol Chem* **283**: 29175-29185.

Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT (2007). IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest* **117**: 1538-1549.

Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK *et al* (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* **23**: 479-490.

Shimpo M, Morrow DA, Weinberg EO, Sabatine MS, Murphy SA, Antman EM *et al* (2004). Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction. *Circulation* **109**: 2186-2190.

Shivakrupa R, Linnekin D (2005). Lyn contributes to regulation of multiple Kit-dependent signaling pathways in murine bone marrow mast cells. *Cell Signal* **17**: 103-109.

Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE (2008). IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol* **20**: 1019-1030.

Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, Nagase H, Tamura C, Komiya A *et al* (2008a). An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J Immunol* **181**: 5981-5989.

Suzukawa M, Koketsu R, Iikura M, Nakae S, Matsumoto K, Nagase H *et al* (2008b). Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils. *Lab Invest* **88**: 1245-1253.

Tatton L, Morley GM, Chopra R, Khwaja A (2003). The Src-selective kinase inhibitor PP1 also inhibits Kit and Bcr-Abl tyrosine kinases. *J Biol Chem* **278**: 4847-4853.

Thomas SM, Brugge JS (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 513-609.

Tian Q, Frierson HF, Krystal GW, Moskaluk CA (1999). Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. *Am J Pathol* **154**: 1643-1647.

Timokhina I, Kissel H, Stella G, Besmer P (1998). Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *EMBO J* **17**: 6250-6262.

Tobe M, Isobe Y, Tomizawa H, Nagasaki T, Takahashi H, Hayashi H (2003). A novel structural class of potent inhibitors of NF-kappa B activation: structure-activity relationships and biological effects of 6-aminoquinazoline derivatives. *Bioorg Med Chem* **11**: 3869-3878.

Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Jolin HE, McKenzie AN (2000). T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* **191**: 1069-1076.

Ueda S, Mizuki M, Ikeda H, Tsujimura T, Matsumura I, Nakano K *et al* (2002). Critical roles of c-Kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor-induced chemotaxis: contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration. *Blood* **99**: 3342-3349.

Ware MF, Tice DA, Parsons SJ, Lauffenburger DA (1997). Overexpression of cellular Src in fibroblasts enhances endocytic internalization of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **272**: 30185-30190.

Weernink PA, Rijksen G (1995). Activation and translocation of c-Src to the cytoskeleton by both platelet-derived growth factor and epidermal growth factor. *J Biol Chem* **270**: 2264-2267.

Weinberg EO, Shimp M, Hurwitz S, Tominaga S, Rouleau JL, Lee RT (2003). Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker. *Circulation* **107**: 721-726.

Wilde A, Beattie EC, Lem L, Riethof DA, Liu SH, Mobley WC *et al* (1999). EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* **96**: 677-687.

Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang F, Wheeler R, Piedrafita D *et al* (1998). Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med* **187**: 787-794.

Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR *et al* (2008). IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 10913-10918.



Xu D, Jiang HR, Li Y, Pushparaj PN, Kurowska-Stolarska M, Leung BP *et al* (2010). IL-33 exacerbates autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* **184**: 2620-2626.

Yagami A, Orihara K, Morita H, Futamura K, Hashimoto N, Matsumoto K *et al* (2010). IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells. *J Immunol* **185**: 5743-5750.

Yamada T, Fujieda S, Yanagi S, Yamamura H, Inatome R, Yamamoto H *et al* (2001). IL-1 induced chemokine production through the association of Syk with TNF receptor-associated factor-6 in nasal fibroblast lines. *J Immunol* **167**: 283-288.

Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ *et al* (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* **6**: 3341-3351.

Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, Broudy VC, Martin FH, Atkins HL *et al* (1990). Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* **63**: 213-224.

## 9 ANHANG

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schema der Signaltransduktion des IL-33-Rezeptors.	7
Abb. 2:	Schema der Signaltransduktion von c-Kit.	11
Abb. 3:	Die Expression des IL-33-Rezeptors auf HMC-1-Zellen.	32
Abb. 4:	Die spezifische Aktivierung von Signalwegen in HMC-1-Zellen durch IL-33.	34
Abb. 5:	Die IL-33-induzierte Zytokinsekretion durch HMC-1-Zellen.	36
Abb. 6:	Src-Kinasen sind Bestandteil der IL-33-vermittelten Signaltransduktion.	38
Abb. 7:	Die IL-33-induzierte Sekretion von IL-6 und IL-8 wird durch Src-Kinasen vermittelt.	40
Abb. 8:	ERK und JNK vermitteln die IL-33-induzierte Sekretion von IL-6 und IL-8.	42
Abb. 9:	Vergleich der Expression von IL-33R und c-Kit zwischen WT-BMMCs und <i>il-33<sup>-/-</sup></i> -BMMCs.	45
Abb. 10:	<i>il-33<sup>-/-</sup></i> -BMMCs sind nicht durch IL-33 stimulierbar.	46
Abb. 11:	Die Stimulation von <i>il-33<sup>-/-</sup></i> -BMMCs mit IL-33 induziert keine IL-6-Sekretion.	47
Abb. 12:	<i>kit<sup>D814V</sup></i> tg-BMMCs exprimieren den IL-33-Rezeptor und c-Kit.	49
Abb. 13:	Konstitutiv aktives c-Kit ist Bedingung für die Involvierung von Src-Kinasen in die IL-33R-Signaltransduktion.	50

<b>Abb. 14:</b>	<b>Die IL-33R-Signaltransduktion in WT-BMMCs wird durch SCF potenziert und durch Src-Kinasen vermittelt.</b>	<b>52</b>
<b>Abb. 15</b>	<b>Die IL-33-induzierte Zytokinsekretion wird durch SCF potenziert und durch Src-Kinasen vermittelt.</b>	<b>54</b>
<b>Abb. 16:</b>	<b>Vergleich der Expression von IL-33R und c-Kit zwischen WT-BMMCs und <i>kit<sup>W-sh/W-sh</sup></i>-BMMCs.</b>	<b>56</b>
<b>Abb. 17:</b>	<b>Die Kostimulation von <i>kit<sup>W-sh/W-sh</sup></i>-BMMCs bewirkt keine signifikante Steigerung der IL-6-Sekretion.</b>	<b>57</b>
<b>Abb. 18:</b>	<b>Überblick über die Position der Src-Kinasen im IL-33R-/c-Kit-Signalnetzwerk</b>	<b>65</b>

## 9.2 Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Name: Tobias Löhn  
Geburtsdatum, -ort: 29.12.1983, Erfurt  
Wohnhaft in: Poststraße 14, 01159 Dresden

### Schul Ausbildung

09/ 1990 – 07/ 1991 Oberschule 2, Erfurt  
09/ 1991 – 07/ 1994 Staatliche Grundschule 7, Erfurt  
09/ 1994 – 06/ 2002 Martin-Luther-Gymnasium Erfurt  
06/2002 Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst

07/ 2002 – 05/ 2003 Psychiatrische Abteilung des Katholischen  
Krankenhauses „St. Johann Nepomuk“ Erfurt;  
Tätigkeit als Pflegeassistent

### Studium

10/ 2003 – 12/ 2010 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-  
Universität Jena  
08/ 2005 – 09/ 2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/ 2008 – 07/ 2009 Beurlaubung vom Studium, Tätigkeit als  
Promotionsstudent am Institut für Immunologie,  
Universitätsklinikum Jena  
10/ 2010 – 12/ 2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Promotion Prof. Dr. Thomas Kamradt, Direktor des Instituts für  
Immunologie, Universitätsklinikum Jena  
Thema: „Der Einfluss von Src-Kinasen auf die  
Signaltransduktion des IL-33-Rezeptors in Mastzellen“  
Förderung durch ein Stipendium des Interdisziplinären  
Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) an der  
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität  
Jena

**Praktische Erfahrung**

09/2006 – 03/2008	Famulaturen in den Fachgebieten Hämatologie/ Onkologie, Gastroenterologie, Kardiologie und Arbeitsmedizin
08/ 2009 – 12/ 2009	1. Tertial des Praktischen Jahres, Anästhesiologie, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Jena (Prof. Dr. K. Reinhart)
12/ 2009 – 03/ 2010	2. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin, Klinik für Pneumologie, Schlaf- und Beatmungsmedizin, Helios Klinikum Erfurt (CA Dr. K.-M. Deppermann)
03/ 2010 – 07/ 2010	3. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Jena (Prof. Dr. U. Settmacher)

**Beruflicher Werdegang**

seit 04/2011	Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin und Kardiologie, Herzzentrum Dresden, Universitätsklinik an der Technischen Universität Dresden (Prof. Dr. R. H. Strasser)
--------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Dresden, 26.03.2012

Tobias Löhn

### 9.3 Danksagung

Zunächst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Thomas Kamradt, der mir die Möglichkeit gab, an seinem Lehrstuhl zu promovieren und mich seit Oktober 2008 wissenschaftlich betreut hat. Die Arbeit am Institut für Immunologie in Jena war für mich eine sehr schöne Zeit – nicht zuletzt wegen der freundlichen und kollegialen Arbeitsatmosphäre – und hat mich sowohl wissenschaftlich-fachlich als auch persönlich sehr geprägt.

Für die Erstellung der Promotionsgutachten danke ich weiterhin Herrn Prof. Dr. Frank-Dietmar Böhmer, Institut für Molekulare Zellbiologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena sowie Herrn Prof. Dr. Axel Roers, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der Technischen Universität Dresden.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Sebastian Drube, der mich auf eine stetige und geduldige Art und Weise durch zahlreiche persönliche Gespräche, konstruktive und kritische Diskussionen sowie etliche aufbauende Worte während meiner Promotion unterstützt hat und zu einem persönlichen Freund geworden ist.

Ausdrücklich danke ich an dieser Stelle auch Frau Annett Krause für ihre stets hilfsbereite organisatorische Unterstützung sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Immunologie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin danke ich: Herrn Prof. Dr. Claus Liebmann und Herrn PD Dr. Oliver H. Krämer, Institut für Biochemie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für die zur Verfügung gestellten Antikörper sowie Herrn Prof. Dr. Marcus Maurer, Klinik für Dermatologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin sowie erneut Herrn Prof. Dr. Axel Roers, Institut für Immunologie, Technische Universität Dresden für die zur Verfügung gestellten Zellen und Mäuse.

Größter Dank gebührt schließlich meinen Eltern, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg fortwährend unterstützt haben und mir auch in schweren Zeiten stets zur Seite standen. Ohne sie wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

Abschließend danke ich Frau Annika Lattermann für die Unterstützung und die vielen aufbauenden Worte vor allem in der Endphase des Erstellungsprozesses dieser Arbeit.

## 9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr Prof. Dr. med. Thomas Kamradt,

Herr Dr. rer. nat. Sebastian Drube,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Dresden, 26.03.2012

Tobias Löhn